

Die Reelinabhängige Signalkaskade in der Alzheimerpathologie

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Anja Donath

aus Finsterwalde
Februar 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden z.T. am Institut Neuropathologie am Universitätsklinikum Münster und z.T. am Institut für Pathologie und Neuropathologie, im Bereich Neuropathologie am Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hynek Burda
2. Gutachter: Prof. Dr. Kathy Keyvani
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Nicole Dünker

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2012

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Herring, A., **Donath, A.**, Yarmolenko, M., Uslar, E., Conzen, C., Kanakis, D., Bosma, C., Worm, K., Paulus, W., and Keyvani, K. (2012). Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J.* 26, 117-128.

Herring, A.*, **Donath A.***, Steiner K.M.; Widera, M.P.; Hamzehian S.; Kanakis D., Koelble, K., ElAli, A., Hermann D.M., Paulus, W., Keyvani, K. (2012) Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer pathology. *J Alzheimers Dis.* 29, 1–17.

* equally contributing authors

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1. Einleitung	11
1.1. Alzheimer-Krankheit	11
1.1.1. Epidemiologie und Klinik	11
1.1.2. Histopathologie und Pathophysiologie	12
1.1.2.1. beta-Amyloid Plaques	12
1.1.2.2. Neurofibrilläre Tangles und <i>neuropil threads</i>	13
1.1.2.3. Neurovaskuläre Veränderungen	14
1.1.2.4. Inflammation.....	15
1.1.2.5. Oxidativer Stress.....	16
1.1.2.6. Diagnostik der AD nach CERAD und Braak & Braak	16
1.1.3. Therapie.....	18
1.2. Reelin-Signalkaskade.....	22
1.2.1. Rolle von Reelin während der Entwicklung und im adulten Gehirn	22
1.2.2. RELN und die Alzheimerkrankheit	24
2. Fragestellung	26
3. Methoden.....	28
3.1. Tiere/Menschen	28
3.1.1. Mausmodell	28
3.1.1.1. Haltungsbedingungen.....	28
3.1.1.2. Studienaufbau	29
3.1.1.2.1. Untersuchung der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen von Mäusen	29
3.1.1.2.2. Pränatale und postnatale Stimulation in der Maus.....	30
3.1.2. Mensch	31
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.1. Genotypisierung.....	32
3.2.1.1. Lyse von murinen Ohrbiopsien.....	32
3.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung	33
3.2.2. Gewebeisolierung	35
3.2.2.1. Murines Hirngewebe	35
3.2.2.2. Humanes Hirngewebe	36
3.2.3. TRIzol-Extraktion Maus und Mensch.....	37
3.2.4. DNase-Behandlung und Aufreinigung der murinen RNA	38
3.2.5. Quantitative und qualitative Bestimmung der RNA	39
3.2.6. Quantitative <i>real-time</i> PCR (TaqMan- <i>assay</i>).....	40
3.2.6.1. cDNA-Synthese	40
3.2.6.2. Durchführung der quantitativen <i>Real-time</i> PCR.....	41
3.2.7. Hypermethylierungsanalyse	42
3.2.7.1. DNA-Isolierung	43
3.2.7.2. Natriumhydrogensulfitkonvertierung.....	43
3.2.7.3. Methylierungs-PCR	44
3.2.7.4. <i>Cycle Sequencing</i> und Sequenzierung	46
3.3. Proteinbiochemische Methoden.....	47
3.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
3.3.2. Western blot und Immundetektion.....	48

3.3.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.3.2.2.	Lineare Gradientengelelektrophorese	49
3.3.2.3.	Blotting	50
3.3.2.4.	Proteindetektion	50
3.3.3.	Immunhistochemie.....	52
3.3.4.	Histochemie	53
3.4.	Morphometrische Auswertung	54
3.5.	Statistik.....	55
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Expressionsmuster der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen von Maus und Mensch.....	56
4.1.1.	RELN-Expression in AD-relevanten Hirnarealen der Maus.....	56
4.1.1.1.	Reduzierte Expression von RELN ist ein frühes Phänomen in TG-Mäusen	56
4.1.1.2.	Erhöhte RELN-Prozessierung in Mäusen mit gestörtem RELN-Level	59
4.1.1.3.	Lokalisierung von RELN in AD-relevanten murinen Hirnarealen; eine morphometrische Analyse	60
4.1.1.4.	RELN-positive Ablagerungen im murinen Neokortex	62
4.1.1.5.	Unveränderte <i>Reln</i> -Genexpression im murinen Gehirn.....	63
4.1.1.6.	Expression der nachgeschalteten Proteine des murinen RELN-Signalwegs nimmt mit dem Alter ab	64
4.1.1.6.1.	APOER2-Level im HC von alten Mäusen herunterreguliert.....	64
4.1.1.6.2.	Reduzierte VLDLR-Expression im HC von alten Mäusen	65
4.1.1.6.3.	Abnahme des DAB1-Levels im HC von alten Mäusen	66
4.1.2.	RELN-Expression in AD-relevanten Hirnarealen von Menschen.....	67
4.1.2.6.	RELN-Defizienz tritt in einem frühen präklinischen AD-Stadium auf	67
4.1.3.1.	Unveränderte RELN-Prozessierung in allen humanen AD-relevanten Hirnarealen	69
4.1.3.2.	RELN-Reduktion im präklinischen Stadium von AD; eine morphometrische Analyse	70
4.1.3.3.	RELN-positive Ablagerungen FC und HC von AD-Patienten.....	72
4.1.3.4.	Herunterregulierung von <i>RELN</i> auf transkriptioneller Ebene im humanen Gehirn	73
4.1.3.5.	Die nachgeschalteten Proteine des humanen RELN-Signalwegs in AD und Alter	74
4.1.3.5.1.	Unveränderte APOER2-Expression im Menschen	74
4.1.3.5.2.	Reduzierung der VLDLR-Expression in Folge der AD im Menschen	75
4.1.3.5.3.	Überexpression von DAB1 im HC und EC von AD-Patienten	76
4.2.	Regulation des RELN-Signalweges in Abhängigkeit von pränatalem und postnatalem <i>Enrichment</i>	77
4.2.3.	RELN-Expression in pränatal stimulierten Mäusen hochreguliert.....	78
4.2.3.1.	Western blot-Analyse zeigte eine Erhöhung des RELN-Levels in pränatal stimulierten Mäusen	78
4.2.3.2.	Lokalisation von RELN im HC von prä- und postnatal stimulierten Mäusen	79
4.2.3.3.	Unverändertes Methylierungsmuster des <i>Reln</i> -Promoters in pränatal stimulierten Mäusen	80
4.2.4.	Unveränderte Expression der nachgeschalteten Proteine der RELN-Signalkaskade in prä- und postnatal stimulierten Mäusen	81
5.	Diskussion	82
5.1.	RELN-Signalkaskade in der AD-Pathologie von Mensch und Maus	82
5.1.1.	Reduktion von RELN ist ein frühes Phänomen in der AD-Pathologie.....	82
5.1.2.	Reelin aggregiert in AD-betroffenen Gehirnen	85
5.1.3.	Nachgeschaltete Mitglieder des RELN-Signalwegs	86
5.1.4.	Die RELN-Signalkaskade in murinen und humanen Gehirnen.....	87
5.2.	Reelinsignalkaskade bei maternaler und postnataler Aktivität	90

5.2.1. Maternale körperliche Aktivität erhöht das Proteinlevel an RELN der Nachkommenschaft	91
5.2.2. Epigenetik als mögliche Verbindung zwischen Verhalten und Hirnplastizität	93
6. Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
A β	Beta-Amyloid
AD	<i>Alzheimer Disease</i> , Alzheimer-Krankheit
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APOER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> , Amyloidvorläuferprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CAA	<i>Cerebral amyloid angiopathy</i> , Zerebrale Amyloidangiopathie
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry of Alzheimer Disease</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAB1	<i>Disabled-1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxynukleinsäure</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-Nukleosidtriphosphat
EC	Entorhinalkortex
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EH	<i>enriched</i> (angereicherte) Haltung,
EtOH	Ethanol
FAD	familiäre Alzheimer-Krankheit
FC	Frontalkortex
FL	<i>full length</i> , ungeschnittenes Protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HC	Hippokampus
Igpal	Octylphenyl-polyethylene Glycol
KA	Kontrolle Alt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

KJ	Kontrolle Jung
LDLR	<i>Low-density lipoprotein</i> Rezeptoren
LTP	Langzeitpotenzierung
LR	Laufrad
LSD	<i>Fisher's least significant difference</i>
M	Mol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaOH	Natronlauge
NFT	neurofibrilläre Tangle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	postnatal
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
RELN	Reelin
RNA	<i>Ribonucleinacid</i> , Ribonukleinsäure
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> , Reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> , Fehler des Stichproben-Mittelwertes
SFK	<i>Src Family</i> Kinase
SH	<i>standard</i> (nicht angereicherte) Haltung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
TgCRND8	transgen CRND8
VLDLR	<i>Very Low-Density</i> Lipoprotein Rezeptor
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Seniler Plaque.	13
Abbildung 2: Beispiel eines neurofibrillären Tangles (NFT).	14
Abbildung 3: Beispiel einer CAA der meningialen und kortikalen Gefäße nach einer Immunfärbung mit einem anti-A β -Antikörper (verändert nach Attems et al., 2004).	15
Abbildung 4: Beispiel eines von zerebralen Mikrogliazellen (braun) umzingelten Amyloidplaques (blau, Pfeil, nach Frautschy et al., 1998).	16
Abbildung 5: Verteilungsmuster der beta-Amyloidplaques.	17
Abbildung 6: Verteilungsmuster der neurofibrillären Tangles (NFT).	18
Abbildung 7: Rolle von Reelin und der Reelinabhängigen Signalkaskade auf die funktionelle und strukturelle Plastizität im Gehirn.	24
Abbildung 8: Eine Reduktion des Proteinlevels von Reelin (RELN) ist ein frühes Phänomen in den transgenen Mäusen (TG), tritt aber erst sehr spät in Wildtypmäusen (WT) auf.	58
Abbildung 9: Eine erhöhte Reelinprozessierung ist ein frühes Phänomen in den transgenen Mäusen (TG), tritt aber erst sehr spät in Wildtypmäusen (WT) auf.	59
Abbildung 10: Morphometrische Auswertung der RELN-Positivität.	61
Abbildung 11: Extrazelluläre RELN-positive Ablagerungen im Neokortex von TG (P210).	62
Abbildung 12: mRNA-Expression von Reelin (<i>Reln</i>).	63
Abbildung 13: Altersbedingte APOER2-Reduktion.	64
Abbildung 14: Altersbedingte VLDLR-Reduktion.	65
Abbildung 15: Altersbedingte DAB1-Reduktion.	66
Abbildung 16: Reelindefizienz zeigte sich in AD-Patienten, aber nicht in gesunden älteren Menschen.	68
Abbildung 17: Unveränderte Prozessierung von Reelin.	69
Abbildung 18: RELN-Defizienz trat bereits im frühesten Krankheitsstadium der AD auf, nicht jedoch in gleichaltrigen gesunden Menschen.	71
Abbildung 19: Extrazelluläre RELN-positive Ablagerungen im Neokortex von AD-Patienten (CERAD C/ Braak & Braak V-VI Stadium, C/V-VI).	72
Abbildung 20: mRNA-Expression von Reelin (RELN).	73
Abbildung 21: Unveränderte APOER2-Reduktion.	74
Abbildung 22: AD-bedingte VLDLR-Reduktion.	75
Abbildung 23: Alzheimerbedingte DAB1-Überexpression.	76
Abbildung 24: Maternale Aktivität förderte die RELN-Expression.	78
Abbildung 25: Maternale Aktivität förderte die RELN-Expression (Immunhistochemie).	79
Abbildung 26: Weder maternale noch postnatale Aktivität förderte die Expression der nachgeschalteten Mitglieder der RELN-Signalkaskade.	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der TgCRND8-Mäuse für die Untersuchung der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen.	29
Tabelle 2: Prä- und postnatale Stimulation.....	31
Tabelle 3: Anzahl der humanen Fälle für die immunhistochemischen Untersuchungen von RELN in AD-relevanten Hirnarealen.	31
Tabelle 4: Anzahl der humanen Fälle für die Western blot- und <i>TaqMan</i> -Untersuchungen der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen.....	32
Tabelle 5: Puffer/ Komponenten für die Agarosegel-Elektrophorese zur Genotypisierung. ...	33
Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung.	34
Tabelle 7: PCR-Mix für die Genotypisierung.....	34
Tabelle 8: PCR-Programm für die Genotypisierung.....	34
Tabelle 9: Entwässerungsprotokoll für formaldehydfixiertes Gewebe.....	36
Tabelle 10: Puffer für die TRIzolextraktion.	37
Tabelle 11: Pipettiermix für DNase-Behandlung.....	38
Tabelle 12: Puffer zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der RNA-Menge.....	39
Tabelle 13: 2x Mix für die cDNA-Synthese.	40
Tabelle 14: PCR-Programm für cDNA-Synthese.	40
Tabelle 15: PCR-Mix für Qualitätskontrolle der cDNA.	41
Tabelle 16: PCR-Programm für Qualitätskontrolle der cDNA.....	41
Tabelle 17: PCR-Mix für <i>Real-time</i> -PCR.....	42
Tabelle 18: <i>Real-time</i> -Programm.	42
Tabelle 19: Puffer für die Natriumhydrogensulfitkonvertierung.	43
Tabelle 20: Primer für die Methylierungs-PCR.....	44
Tabelle 21: PCR-Mix für die Methylierungs-PCR.....	45
Tabelle 22: PCR-Programm für die Methylierungs-PCR.....	45
Tabelle 23: <i>Cycle Sequencing</i> -Mix.	46
Tabelle 24: <i>Cycle Sequencing</i> -Programm.....	47
Tabelle 25: Puffer/Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.....	48
Tabelle 26: Puffer/ Lösungen für die lineare Gradientengelelektrophorese.....	49
Tabelle 27: Puffer/ Lösungen für das Blotting.....	50
Tabelle 28: Lösung für die Proteindetektion.	50
Tabelle 29: Primärantikörper für Maus und Mensch.	51
Tabelle 30: Sekundärantikörper für Maus und Mensch.....	52

1. Einleitung

1.1. Alzheimer-Krankheit

1.1.1. Epidemiologie und Klinik

Vor über 100 Jahren berichtete erstmalig Alois Alzheimer über eine Krankheit des Gehirns, die durch Gedächtnisstörungen, Desorientierung und Paranoia auffiel und in der Neuropathologie durch Proteinablagerungen (Plaques) und fibrilläre Bündel (Tangles) gekennzeichnet war (Alzheimer, 1907). Diese Krankheit wurde später nach ihrem Entdecker „Alzheimer-Krankheit“ (engl. *Alzheimer's Disease*, AD) benannt.

Die AD ist die häufigste Form der Demenz (~60% aller Demenzfälle), bei einer Prävalenz von etwa 2% aller 60-65 Jährigen. Die Prävalenz steigt kontinuierlich und erreicht ab dem 85. Lebensjahr sogar einen Prozentsatz von 33. 2001 gab es 28 Millionen Demenzkranke weltweit und neuere Studien prognostizieren, dass sich auf Grund der höheren Lebenserwartung diese Zahl bis zum Jahr 2050 auf 106 Millionen Menschen erhöht (Brookmeyer et al., 2007).

Die meisten Fälle der AD treten sporadisch auf. Allein etwa 5% der Fälle sind auf Mutationen im Genom zurückzuführen. Risikofaktoren für das Auftreten der sporadischen AD sind neben dem Alter als größter Faktor noch eine geringe körperliche und mentale Aktivität, niedrige Bildung, sowie vaskuläre Krankheiten wie Hypercholesterolaemie, Hypertension und Arteriosklerose, aber auch Rauchen und Diabetes mellitus als mögliche Risikofaktoren benannt (Barnes and Yaffe, 2011).

Mutationen in den Genen des Amyloidvorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) sowie Presenilin 1 und 2 können zu einer frühen familiären Form von AD (FAD) führen. Klinisch und morphologisch ist diese nicht von der sporadischen Form abgrenzbar, tritt allerdings schon vor dem 65. Lebensjahr auf. Die Prävalenz der FAD bei unter 65 Jährigen liegt bei unter 0,1% (Harvey et al., 2003).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Variationen des Apolipoprotein E (ApoE)-Gens, im Besonderen des ApoE4, als Risikofaktoren für das spontane Auftreten von AD gelten. Heterozygote Träger der ApoE-Variante 4 haben ein dreifach erhöhtes Risiko, homozygote Träger sogar ein 15-fach höheres Risiko als Individuen ohne diese Mutation, an AD zu erkranken (Farrer et al., 1997; Meyer et al., 1998; Poirier et al., 1993).

Der molekulare Mechanismus mittels dessen ApoE4 zur Pathogenese von AD beiträgt, ist bisher noch nicht geklärt. ApoE transportiert in der Regel Cholesterin in das Gehirn, innerhalb der ApoE-Familie weist ApoE4 in diesem Zusammenhang allerdings die geringste Aktivität auf (Poirier, 1994). Zudem scheint ApoE wichtig für die Aggregation von beta-Amyloid zu sein, was zur Plaque-Bildung beitragen kann (Holtzman et al., 2000).

Klinische Symptome für AD sind kognitive Defizite, genauer gesagt Probleme beim Erlernen von neuen Informationen und in der Orientierung. Im Verlauf der Krankheit schreitet der Verlust des Gedächtnisses fort und es zeigen sich Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten, Depressionen und Angstattacken. In der letzten Phase werden die Patienten zunehmend bettlägerig, haben ein erhöhtes Risiko an Infektionen zu erkranken und bedürfen intensiver Pflege (Heneka and O'Banion, 2007; Walsh and Selkoe, 2004).

1.1.2. Histopathologie und Pathophysiologie

In der Histologie des AD-erkrankten Gehirns finden sich neuritische Plaques mit beta-Amyloid (A β) als Hauptbestandteil und daneben Tangles, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Plaques und Tangles gelten als die wichtigsten Kriterien zur *post mortem* Diagnose von AD. Es zeigen sich außerdem Degenerationen von Neuronen und Synapsen sowie eine Erhöhung der Inflammation, des oxidativen Stresses und neurovaskulärer Störungen im Gehirn.

1.1.2.1. beta-Amyloid Plaques

Der Hauptbestandteil der neuritischen Plaques ist das A β -Peptid, das aus der enzymatischen Spaltung des APP stammt. APP spielt vermutlich bei der neuronalen Migration und Steuerung der Wachstumskegel von Axonen (Hoe and Rebeck, 2008), sowie axonaler Ausdünnung eine Rolle (Nikolaev et al., 2009). Bei einer pathologischen Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase entstehen A β -Filamente, welche zu den sogenannten Plaques im Neuropil des Gehirns aggregieren. Diese Plaques besitzen unterschiedliche Formen. Zum Einen gibt es neuritische Amyloidplaques, die meist durch einen dichten Kern und eine diffuse Korona gekennzeichnet sind (Abbildung 1), diese lassen sich z.B. durch eine Immunfärbung für A β oder eine ThioflavinS-Färbung nachweisen. Zum Anderen gibt es diffuse und indifferente Amyloidplaques, die nach einer A β -Färbung schwach oder

sogar A β -negativ gefärbt erscheinen. Es wird angenommen, dass diese Plaqueform möglicherweise der Aggregationsursprung für die neuristischen Plaques ist (Selkoe, 2001).

Hinsichtlich des Einflusses der neuritischen Plaques auf den Krankheitsverlauf gibt es verschiedenste Hypothesen. Eine Hypothese besagt, dass die neuritischen Plaques selbst neurotoxisch wirken und/oder, dass das in löslichen Fraktionen vorliegende A β -Protein die Langzeitpotenzierung (LTP) hemmt und als Folge Störungen des Gedächtnisses verursachen (Haass and Selkoe, 2007).

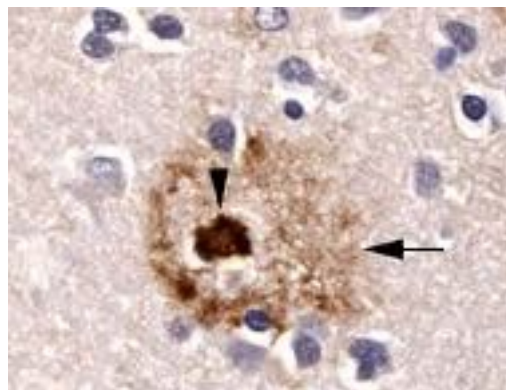


Abbildung 1: Seniler Plaque.

Nach Immunfärbung mit einem anti-A β -Antikörper sieht man einen dichten Kern (Pfeilkopf) mit einer diffusen Korona (Pfeil, verändert nach Duyckaerts et al., 2009).

1.1.2.2. Neurofibrilläre Tangles und *neuropil threads*

Hyperphosphoryliertes Tau aggregiert im perinukleären Zytoplasma von Neuronen zu den neurofibrillären Tangles (NFTs, Abbildung 2) und in den Dendriten zu den „*neuropil threads*“. Physiologisch ist Tau ungefaltet und in Axonen lokalisiert (Mandelkow et al., 2007). Die Aufgabe von Tau ist die Stabilisierung des Zytoskeletts und damit u.a. die Aufrechterhaltung der Plastizität des Gehirns (Bullmann et al., 2007; Lee et al., 2001; Timm et al., 2006).

Erst durch eine Hyperphosphorylierung des Proteins kommt es zur Bildung von NFTs und „*neuropil threads*“ (Binder et al., 2005; Duyckaerts et al. 2009, Mandelkow and Mandelkow, 1998). Diese können unter anderem den axonalen Transport stören und so zur Apoptose der Nervenzellen führen (Selkoe, 2001; Walsh and Selkoe, 2004).

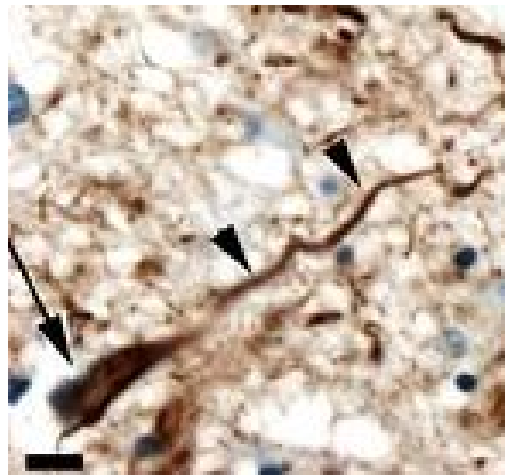


Abbildung 2: Beispiel eines neurofibrillären Tangles (NFT).

Das hyperphosphorylierte Tau, sichtbar gemacht durch einen AT8-Antikörper, befindet sich sowohl im Soma (Pfeil) als auch im Dendriten (Pfeilkopf) des Neurons (nach Duyckaerts et al. 2009).

1.1.2.3. Neurovaskuläre Veränderungen

Das Gehirn ist ein gut durchblutetes Organ. Der Transport von Nährstoffen, Hormonen und möglichen Toxinen (wie metabolische Endprodukte und A β) zwischen Hirn und Blutkreislaufsystem wird durch die Blut-Hirnschranke vermittelt (Zlokovic, 2005).

Bei der AD ist eine der häufigsten neurovaskulären Störungen die sogenannte zerebrale Amyloid-Angiopathie (*cerebral amyloid angiopathy*, CAA; Abbildung 3). Hierbei setzt sich beta-Amyloid intramural in den Blutgefäßen ab, deformiert die Endothelzellen und verhindert eine adäquate Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Nährstoffen. Außerdem ist der Abtransport von Giftstoffen ebenfalls gestört, was zu einer erhöhten Inflamationsreaktion führt (Attems et al., 2004; Zhang-Nunes et al., 2006; Zlokovic, 2005).

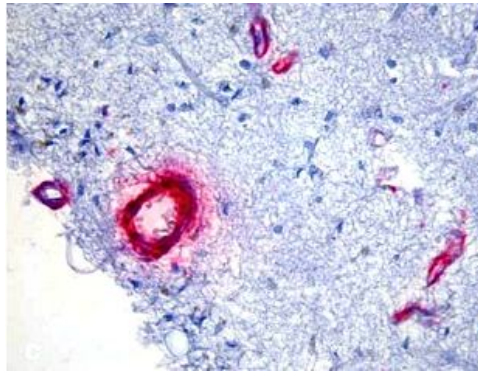


Abbildung 3: Beispiel einer CAA der meningealen und kortikalen Gefäße nach einer Immunfärbung mit einem anti-A β -Antikörper (verändert nach Attems et al., 2004).

1.1.2.4. Inflammation

Inflamationsprozesse helfen dem Körper einerseits die Verursacher für Zellschäden zu bekämpfen. Andererseits kann eine übermäßige Immunantwort auch zum Zelltod führen. Die Bildung von Plaques und Tangles aktiviert eine inflammatorische Reaktion des Gehirns. Die daraufhin stattfindende Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten führt zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren (Chemokine, Zytokine und Neurotransmitter) (Tansey et al., 2007). Mikrogliazellen können mittels Phagozytose schädliches beta-Amyloid abbauen und so das Voranschreiten der AD aufhalten (Abbildung 4; Akiyama et al., 2000; Boche and Nicoll, 2008; Rogers et al., 2002; Wyss-Coray, 2006).

Im Gegensatz dazu kann eine verstärkte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Molekülen zu einer Überexpression von APP und dessen amyloidogener Prozessierung führen und gleich einem Teufelskreis eine weitere Ausschüttung von inflammatorischen Molekülen in den Mikroglia fördern (Vasto et al., 2008). Dies kann bei ausbleibendem Abtransport des beta-Amyloids zu einer chronischen Entzündung des Gehirns führen (Golde, 2002).

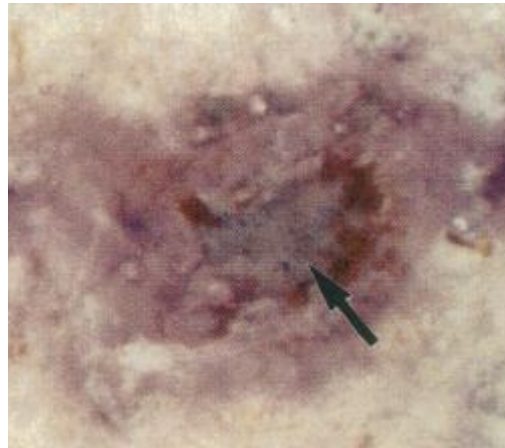


Abbildung 4: Beispiel eines von zerebralen Mikrogliazellen (braun) umzingelten Amyloidplaques (blau, Pfeil, nach Frautschy et al., 1998).

1.1.2.5. **Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht von erhöhten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies in den Zellen (*reactive oxygen species* [ROS]/ *reactive nitrogen species* [RNS]) (Castellani et al., 2006; Miranda et al., 2000). ROS und RNS sollen im Körper eine nicht-pathologische Inflamationsreaktion noch verstärkt und so anti-mikrobiell wirken (*respiratory burst*; Forman and Torres, 2002). Oxidativer Stress spielt in der AD ebenfalls eine Rolle und zwar möglicherweise zeitlich vor Ausbildung von Plaques und Tangles (Manczak et al. 2006). Studien haben gezeigt, dass ROS und RNS exzessiv in der AD gebildet werden und diese auch mit A β -Plaques und NFT kolokalisiert sind (Miranda et al., 2000). Diese Ansammlung von ROS und RNS steht in Verbindung mit inflammatorischen Reaktionen und führt vermehrt zur Apoptose (Marques et al., 2003).

1.1.2.6. **Diagnostik der AD nach CERAD und Braak & Braak**

Es wird angenommen, dass bereits 20-30 Jahre vor der Manifestation erster klinischer Symptome die ersten Plaques und Tangles auftreten und im Laufe des Lebens in ihrer Zahl zunehmen (Blennow et al., 2006). Gleichwohl kann die AD auch heute nur *post mortem* eindeutig diagnostiziert werden. Für diese Diagnostik wird die Anzahl und Lage der beta-Amyloid Plaques und Tangles in den AD-relevanten Hirnarealen, Frontalkortex, Entorhinalkortex und Hippokampus, untersucht und das Alter mit einbezogen. In Deutschland ermittelt man den Grad der Ausprägung der AD

mithilfe eines neuropathologischen Protokolls, das vom *Consortium to Establish a Registry of Alzheimer Disease* (CERAD, Abbildung 5) und von Braak & Braak (Abbildung 6) vorgeschlagen wurde (Braak and Braak, 1991; Mirra et al., 1991, Mirra et al., 1993). Hierbei bezieht sich die Stadieneinteilung nach dem CERAD-Protokoll auf die Ausprägung und Lokalisation der neuritischen Amyloidplaques (Abbildung 5).

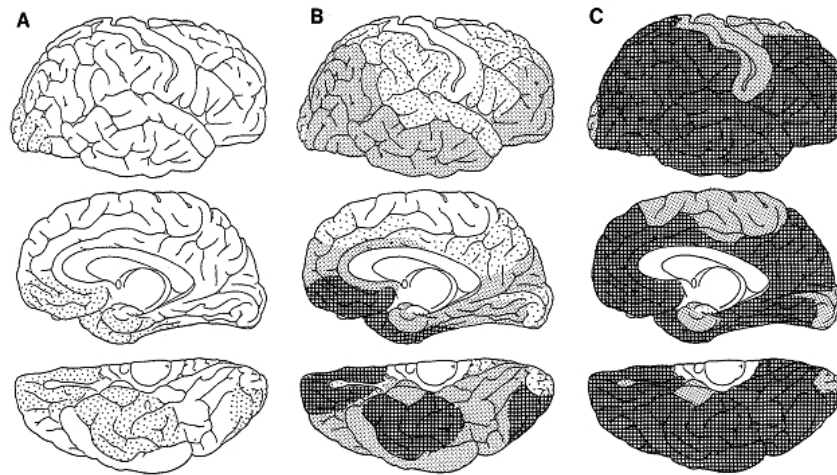


Abbildung 5: Verteilungsmuster der beta-Amyloidplaques.

(A) Im CERAD A-Stadium zeigen sich die ersten Plaques im basalen Isokortex. (B) Im weiten Verlauf, CERAD B-Stadium, zeigen sie die Ablagerungen des Amyloids im gesamten Isokortex und auch im Hippokampus. (C) Zuletzt, im CERAD C-Stadium, sind nahezu alle Hirnregionen von Amyloidablagerungen betroffen. Je dunkler die Schattierung, desto belasteter ist das Areal mit Amyloidplaques (nach Braak und Braak, 1991).

Die Braak & Braak-Einstufungen beschreiben die Lage und die Anzahl der Tangles (Abbildung 6).

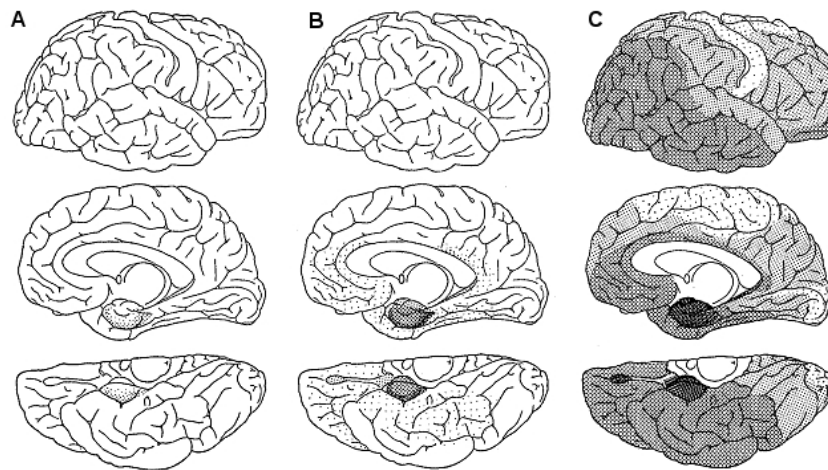


Abbildung 6: Verteilungsmuster der neurofibrillären Tangles (NFT).

(A) Im Braak & Braak I-II-Stadium zeigen sich die ersten NFTs in der Transentorhinalregion. (B) Im weiteren Verlauf, Braak & Braak III-IV-Stadium, zeigen sich NFTs auch im Entorhinalkortex. (C) Zuletzt, im Braak & Braak V-VI-Stadium, sind nahezu alle Hirnregionen von NFTs betroffen. Je dunkler die Schattierung, desto belasteter ist das Areal mit NFTs (nach Braak und Braak, 1991).

Bei der Einstufung der alzheimererkrankten Menschen spricht man bei einem CERAD A/ Braak & Braak I-II-Stadium von einem präklinischen Stadium, weil sich noch keine der typischen klinischen Symptome der AD-Krankheit feststellen lassen. Die wenigen beta-Amyloid Plaques bzw. Tangles finden sich im Gehirn nur in den basalen Arealen des Iso- bzw. transentorhinalen Kortex (Abbildung 5A und Abbildung 6A). Im Stadium CERAD B/ Braak & Braak III-IV-Stadium zeigen sich erste Gedächtnisverluste und Orientierungsschwierigkeiten, es sind immer mehr Hirnareale von den Plaques bzw. Tangles betroffen (u.a. Gesamt-Isokortex bzw. Hippokampus und der gesamte Entorhinalkortex, Abbildung 5B und Abbildung 6B). CERAD C/ Braak & Braak V-VI-Stadium ist die Endstufe der AD-Krankheit; Hirne dieser Patienten zeigen eine maximale Belastung mit Plaques bzw. Tangles in nahezu allen Hirnregionen (Abbildung 5C und Abbildung 6C; Braak and Braak, 1991; Mirra et al., 1991, Mirra et al., 1993).

1.1.3. Therapie

Bis heute ist keine kurative Therapie für die AD verfügbar. Es gibt Bemühungen, wenigstens das Voranschreiten der Krankheit mittels medikamentöser Behandlung zu verlangsamen oder zumindest die Symptomatik zu verbessern.

Acetylcholinesterase-Hemmer bzw. nicht-kompetitive N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-Antagonisten sollen Störungen der Gedächtnisbildung und andere kognitive Störungen verringern (Blennow et al., 2006). Diese haben, wenn überhaupt, nur einen moderaten und zeitlich begrenzten Einfluss auf die Symptome (Blennow et al., 2006) und nicht unerhebliche Nebenwirkungen (z.B. Übelkeit, Erbrechen und Durchfall). Aktuell werden Medikamente entwickelt, die das Potential besitzen, direkt in den Krankheitsmechanismus eingreifen zu können. Diese Stoffe befinden sich momentan im Tierversuch oder in der klinischen Austestung. Ziel der neuen therapeutischen Strategien ist unter anderem die Inhibition der A β -Produktion (γ -Sekretase- und BACE-Inhibitoren) und -Aggregation sowie Förderung der A β -*Clearance* (A β -Immunisierung). Jedoch traten vermehrt Nebenwirkungen auf. So mussten z.B. zwei klinische Studien zum Einsatz von γ -Sekretase-Inhibitoren in milder bis moderater AD in der Phase III vorzeitig abgebrochen werden, da gastrointestinale Symptome und Hautkrebs auftraten (Selkoe, 2011). Außerdem zeigten in einer klinischen Studie zur A β -Immunisierung 6% aller behandelten Patienten eine akute Meningoenzephalitis, weshalb die Studie vorzeitig abgebrochen wurde (Ongogozo, 2003; Wisniewski and Konietzko, 2008).

Präventive Maßnahmen zur Bekämpfung der AD, die wenige oder keine Nebenwirkungen besitzen, erscheinen daher als vielversprechender Forschungsansatz. Diverse Studien zeigen, dass körperliche und geistige Aktivität zu einem schwächeren Verlauf der AD führen kann. Korrelationen zwischen Bildungsstand und Auftreten der AD zeigten ein geringeres Risiko der Erkrankung bei Menschen mit höherem Bildungsstand (Fratiglioni et al., 2004; Friedland et al., 2001; Wilson et al., 2002).

Zahlreiche Untersuchungen im Tiermodell haben einen positiven Einfluss einer Umweltanreicherung (sog. *Environmental Enrichment*) auf die Kognition der Tiere feststellen können. Als *Environmental Enrichment* bezeichnet man die Anreicherung der Käfighaltung bei Labortieren mit sensorischen, physischen und kognitiven Stimuli. Dieses experimentelle Paradigma geht auf eine Entdeckung von Donald Hebb zurück (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Er fand bereits 1947 heraus, dass Ratten, die als Haustiere gehalten wurden, im Vergleich zu ihren Artgenossen aus dem Labor wesentlich besser in Lerntest abschnitten (Hebb, 1947). Damit

ebnete er den Weg für eine Reihe weiterer Experimente, die den Einfluss von *Environmental Enrichment* unter anderem auf die AD-Pathologie untersuchten.

Der positive Effekt von *Environmental Enrichment* auf die Neurogenese und die damit verbundene kognitive Leistung von Wildtypmäusen wurde bereits 1997 in der Arbeitsgruppe um Fred Gage untersucht (Kempermann et al., 1997). Die ersten Untersuchungen, die sich experimentell mit positiven Effekten einer Umweltanreicherung auf die AD-Pathologie befassten, wurden erst in den Jahren 2005-2006 veröffentlicht (Adlard et al., 2005; Ambree et al., 2006; Lazarov et al., 2005). Hier wurde erstmalig gezeigt, dass kognitives/phisches Training nicht nur durch Erhöhung der Hirnplastizität und der sog. kognitiven Reserve zu Kompensation der kognitiven Einbußen führt, sondern dass solch ein Training über noch nicht verstandene Mechanismen in die Pathophysiologie der AD eingreift und diese verlangsamt bzw. reduziert. *Environmental Enrichment* reduziert nicht nur die Amyloidpathologie sondern auch den oxidativen Stress (Herring et al., 2010; Um et al., 2008), sowie die neurovaskuläre Dysfunktion (Herring et al., 2008). Zudem ist eine Umweltanreicherung offensichtlich imstande auch im AD-kranken Gehirn eine erhöhte LTP, Neurogenese und Plastizität zu induzieren (Herring et al., 2009; Liu et al., 2011; Wolf et al., 2006). Die Mechanismen, die durch die Umweltanreicherung beeinflusst werden, verändern sich je nach Zeitpunkt der kognitiven und körperlichen Aktivität. So wird bei einer rein therapeutischen Behandlung, also nach Eintritt der A β -Pathologie, tendenziell der oxidative Stress abgebaut und die A β -Aggregation gehemmt. Bei einer rein präventiven Maßnahme wird dagegen die APP-Expression verringert und der Abbau der toxischen A β -Spezies gefördert (Herring et al., 2011).

Die meisten Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Umweltanreicherungen fokussierten sich bislang nur auf das Gehirn des Individuums, das selbst eine Stimulierung erfahren hatte. Eine transgenerationelle Effektübertragung wurde bisher nur selten und dies fast ausschließlich in gesunden Individuen untersucht. Im Menschen scheint die physische Aktivität der Mutter während der Schwangerschaft positiv die Gesundheit des Fötus zu beeinflussen; die Nachkommen zeigen eine verbesserte kognitive Leistung bis hin ins Kindesalter (Clapp, 1996). Ferner konnte festgestellt werden, dass die elterliche Ernährung Einfluss auf den Cholesterin- und Fettmetabolismus der Nachkommen über eine Reprogrammierung des Epigenoms (Methylierung) nimmt (Carone, 2010).

Im Tierexperiment zeigen die Nachkommen der Mäuse, die während ihrer Schwangerschaft im Laufrad gelaufen sind, in diversen Lerntests eine deutlich bessere kognitive Leistung als die jeweilige Kontrollgruppe (deren Mütter nicht gelaufen waren). Diese verbesserte Gedächtnisleistung geht, so Bick-Sander et al., 2006 und Kim et al., 2007, mit einer erhöhten Neurogenese im Hippokampus einher. Arai et al. (2009) konnten in einer sehr eleganten Studie zeigen, dass durch *Enrichment* der Mütter während der Schwangerschaft sogar ein genetischer Defekt in *ras-grf*-Knock-out-Mäusen, der zu einer gestörten LTP führt, in den Nachkommen über zwei Generationen hinweg aufgehoben werden kann.

Die einzige bislang veröffentlichte Studie, die den Effekt der physischen Aktivität einer Generation auf das AD-krankes Gehirn der nächsten Generation untersucht, stammt aus unserem eigenen Labor. Diese kürzlich publizierte Arbeit zeigt, dass physische Aktivität (Laufradlaufen) der Mütter während der Trächtigkeit die A β -Belastung der nächsten Generation reduziert. Dieser Effekt geht u.a. mit einer reduzierten amyloidogenen Prozessierung von APP und verringerten inflammatorischen/oxidativen Prozessen im Gehirn einher (Herring et al., 2012). Es scheint also, dass mit Prävention der AD nicht früh genug begonnen werden kann.

1.2. Reelinsignalkaskade

1.2.1. Rolle von Reelin während der Entwicklung und im adulten Gehirn

Reelin (RELN) ist ein 420 kDa großes Glykoprotein, welches während der Entwicklung des Gehirns von den Cajal-Retzius-Zellen exprimiert und sezerniert wird (Alcantara et al., 1998). Das ungeschnittene RELN (*full length*, FL) wird durch noch unbekannte Proteasen an zwei Stellen geschnitten. So entstehen unter anderem zwei Fragmente, die ~300 kDa und 180 kDa groß sind (Jossin et al., 2004; Lambert de Rouvroit et al., 1999). Das sezernierte RELN bindet an die beiden *Low-density lipoprotein* Rezeptoren (LDLR), Apolipoprotein E Rezeptor 2 (APOER2) und *Very Low-Density Lipoprotein* Rezeptor (VLDLR) und initiiert dadurch eine Phosphorylierung des Adapterproteins *Disabled-1* (DAB1) (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999; Strasser et al., 2004). Über die Phosphorylierung von DAB1 kommt es zu einer Aktivierung von verschiedenen Kinasen, die die Zellproliferation, Apoptose und Neurodegeneration beeinflussen können (Abbildung 7).

Die Rolle von RELN während der Entwicklung des Gehirns ist gut untersucht. Unter anderem konnten durch die Entdeckung der homozygoten Reelermaus wichtige Funktionen von RELN aufgeklärt werden. Die Reelermaus besitzt eine Spontanmutation des RELN-Gens und zeichnet sich durch einen wankenden (engl. *to reel* = schwanken, taumeln) Gang, Ataxie und Tremor aus. Diese motorischen Störungen beruhen hauptsächlich darauf, dass auf Grund des fehlenden RELN (neben der Laminationsstörung des Neokortex) die Foliation des zerebellären Kortex gestört ist (Falconer, 1951; Goffinet et al., 1984; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998). Ähnliche Migrationsstörungen der Neuronen zeigen *Knock-out*-Mäuse für die Rezeptoren APOER2 und VLDLR (Trommsdorff et al., 1999). RELN ist demnach im sich entwickelnden Gehirn für die korrekte Ausbildung der Schichten des Neokortex und die Positionierung der Neuronen in diesen zuständig (Curran and D'Arcangelo, 1998; Del Rio et al., 1997; Frotscher, 1998; Rakic and Caviness, 1995; Rice and Curran, 2001).

Im späteren Verlauf der Entwicklung sterben immer mehr Cajal-Retziuszellen ab (Del Rio et al., 1996). Im adulten Gehirn wird weiterhin RELN gebildet, allerdings hauptsächlich durch die γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen Interneuronen und glutaminergen Pyramidenzellen des Neokortex und Hippokampus (Abraham and Meyer, 2003; Abraham et al., 2004; Alcantara et al., 1998; Baloyannis, 2005; Chin et

al., 2007; Herz and Chen, 2006; Lacor et al., 2000; Miettinen et al., 2005; Pappas et al., 2003; Pesold et al., 1998; Ramos-Moreno et al., 2006). Auch werden APOER2, VLDLR und DAB1 weiterhin exprimiert (Deguchi et al., 2003). Die Aufgabe der RELN-abhängigen Signalkaskade besteht im erwachsenden Gehirn dann in der Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Plastizität. Einige Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen RELN und LTP. So konnte gezeigt werden, dass *Knock-out*-Mäuse, die weder über APOER2 oder VLDLR verfügen eine LTP-Störung aufweisen (Weeber et al., 2002). Es wird angenommen, dass durch die Phosphorylierung von DAB1 in Folge der Aktivierung des RELN-Signalwegs, die *Src Family* Kinasen (SFK) aktiviert und die N-Methyl-d-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren stimuliert werden (Abbildung 7). Diese schleusen daraufhin mehr Ca^{2+} in die Zelle und führen so zu einer Erhöhung der LTP (Chen et al., 2005; Weeber et al., 2002). In heterozygoten Reelermäusen wurde außerdem eine Reduktion des Dendritenwachstums und der *Spine*-Dichte gezeigt, was zu Störungen in der Informationsweiterleitung führt (Niu et al., 2004; Niu et al., 2008).

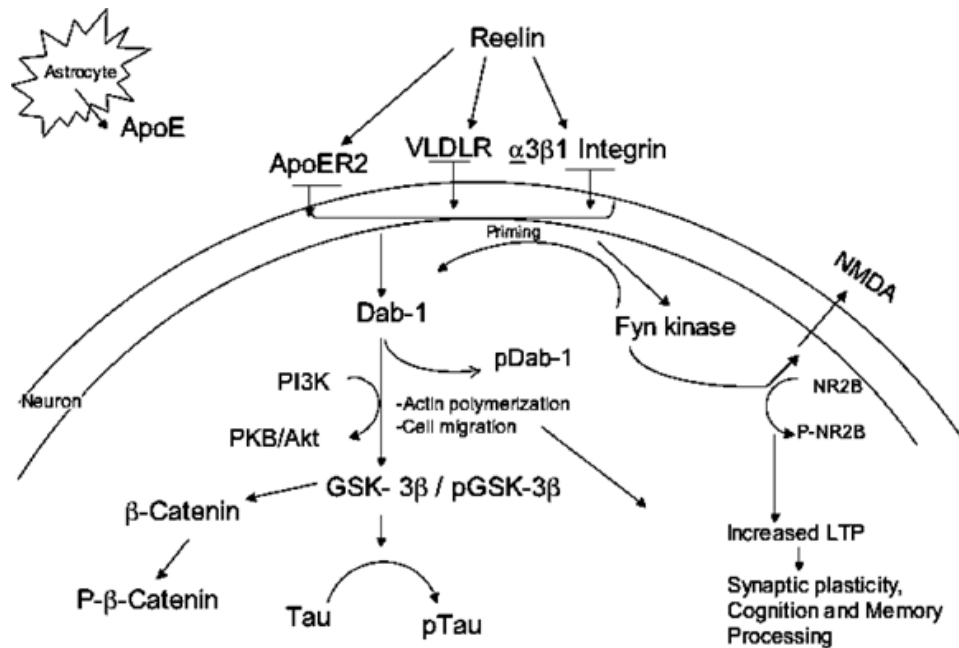


Abbildung 7: Rolle von RELN und der RELN-abhängigen Signalkaskade auf die funktionelle und strukturelle Plastizität im Gehirn.

Das extrazelluläre Glykoprotein Reelin bindet an die Rezeptoren APOER2 und VLDLR und führt dadurch zu einer Phosphorylierung von DAB1. DAB1 aktiviert unter anderem die Src Family Kinase (SFK), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Protein Kinase B (PKB), die dadurch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) hemmen (Beffert et al., 2002). GSK3 β ist die Hauptkinase, die das Mikrotubuli stabilisierende Protein Tau phosphoryliert (Ballif et al., 2003; Beffert et al., 2002; Bock et al., 2003; D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999). Zudem beeinflusst der RELN-Signalweg direkt die Langzeitpotenzierung (LTP). Über APOER2 und VLDLR wird die Untereinheit NR2B des NMDA-Rezeptors phosphoryliert, was wiederum zur Modulation der synaptischen Plastizität führt. (nach Fatemi, 2005)

Störungen im RELN-Signalweg sind bereits im Zusammenhang mit Schizophrenie und Autismus untersucht worden (Impagnatiello et al., 1998; Fatemi et al., 2000, 2001, Abdolmaleky et al., 2005). Da die Beeinträchtigung des Gedächtnisses eines der führenden klinischen Merkmale der AD ist und die RELN-Signalkaskade im adulten Gehirn eine Schlüsselrolle für die Gedächtnisbildung und die Plastizität spielt, liegt ein Zusammenhang zwischen der RELN-Signalkaskade und der AD nahe.

1.2.2. RELN und die Alzheimerkrankheit

Im Jahr 1999 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen RELN und AD hergestellt. Hiesberger et al. (1999) stellten fest, dass Reeler- und Doppel-*Knock-out*-

Mäuse für APOER2 und/oder VLDLR zu einer Hyperphosphorylierung von Tau neigen. Hyperphosphoryliertes Tau neigt dazu sich in die sogenannten Tangles zusammenlagern, die ein wichtiges Merkmal der Alzheimer-Krankheit darstellen. Daneben zeigen *in vitro* Studien, dass die Lipoproteinrezeptoren APOER2 und VLDLR an ApoE binden (Chen et al., 2010; D'Arcangelo et al., 1999; He et al., 2007). APOER2 scheint eine höhere Affinität zur Bindung an die ApoE4-Isoform als an die restlichen Isoformen zu besitzen. Die Bindung von ApoE4 an APOER2 führt zu einer Reduktion der Expression von APOER2 an der Zelloberfläche. Dadurch wird die Fähigkeit von RELN, die NMDA und AMPA Rezeptoren zu aktivieren und die LTP zu erhöhen, gestört (Chen et al., 2010). Außerdem führt die Bindung von ApoE4 an ApoER2 zu einer erhöhten Produktion von A β . Letzteres könnte eine Erklärung dafür sein, dass Träger der ApoE4-Isoform ein erhöhtes Risiko besitzen, an AD zu erkranken (He et al., 2007). APOER2 steht zudem in Wechselwirkung mit APP, so dass der RELN-gesteuerte Signalweg zu einer reduzierten amyloidogenen APP-Prozessierung führen kann (Hoe and Rebeck, 2008; Hoe et al., 2006). Die LTP wird in AD-Patienten durch A β gestört und unterdrückt. Durch RELN kann dieser Effekt rückgängig gemacht werden (Durakoglugil et al., 2009).

Vereinzelte und sich z.T. widersprechende Studien beschreiben eine veränderte RELN-Expression in Patienten und transgenen Mäusen mit einer fortgeschrittenen AD-Pathologie. Zum Einen wurde dargelegt, dass das Level des 180 kDa RELN im Liquor und im Frontalkortex AD-erkrankter Patienten erhöht ist (Botella-Lopez et al., 2006; Botella-Lopez et al., 2010; Saez-Valero et al., 2003). Eine andere Studie zeigt dagegen eine Reduktion des RELN-Levels im Entorhinalkortex und Hippokampus von erkrankten Menschen und Mäusen mit ausgeprägter AD-Pathologie (Chin et al., 2007).

Erst kürzlich wurde der Versuch unternommen *in vivo* den Effekt einer induzierten RELN-Defizienz in AD-Mäusen zu untersuchen (Kocherhans et al., 2010). Dafür wurde erstmals eine transgene AD-Maus-Linie mit heterozygoten Reelermäusen (besitzen etwas 50% des normalen RELN-Levels) gekreuzt. Wie sich herausstellte, hatten die Nachkommen dieser Kreuzung eine erhöhte amyloidogenen APP-Prozessierung. Eine RELN-Reduktion führte zu einem früheren Auftreten und eine vermehrte Anzahl von A β -Plaques ebenso wie einer einsetzenden Tau-Pathologie, den Kardinalsmerkmalen der AD-Pathologie.

2. Fragestellung

Wie oben beschrieben, legen einige *in vitro*-Studien einen Zusammenhang zwischen dem RELN-Signalweg und der AD-Pathologie nah. Vereinzelt, sich z.T. widersprechende Untersuchungen über die Expression von RELN in AD-Patienten und transgenen Mäusen mit einer fortgeschrittenen AD-Pathologie deuten ebenfalls auf eine Störung der RELN-Expression hin.

Die Frage, ob und zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs der AD welche Hirnareale von einer pathologisch erhöhten oder reduzierten RELN-Expression betroffen sind, wurde bislang nur fragmentarisch beantwortet. Völlig unklar ist außerdem, welche Bedeutung den weiteren Mitgliedern der RELN-Kaskade, nämlich APOER2, VLDLR und DAB1, zukommt. Und schließlich bleibt es komplett ungeklärt, ob eine mögliche Störung in RELN-Signalweg eine der Ursachen der Alzheimer-Krankheit darstellt oder als Folge der Erkrankung zu verstehen ist.

Die vorliegende Dissertation widmet sich erstmals durch eine systematische Untersuchung im Detail der Frage nach der Bedeutung der RELN-Kaskade für die Alzheimer-Erkrankung. Die Expression aller Mitglieder der RELN-Signalkaskade werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Verlaufs der AD-Pathologie in AD-relevanten Hirnarealen (Frontal-, Entorhinalkortex und Hippokampus) sowohl im Menschen als auch im Mausmodell untersucht.

Folgende Fragen sollen geklärt werden:

- Welchen Einfluss hat die AD-Pathologie und das Alter auf die Expression der einzelnen Mitglieder der RELN-Signalkaskade?
- Falls eine Störung der RELN-Signalkaskade vorliegen sollte, in welchem Alter oder Stadium der Erkrankung tritt diese auf?
- Gibt es arealspezifische Unterschiede beim Auftreten bzw. der Ausprägungen der Beeinträchtigung des RELN-Signalweges?
- Verstärkt sich diese Störung mit Voranschreiten der Erkrankung oder des Alters?
- Gibt es Hinweise auf die Kausalitätsreihenfolge einer potentiellen RELN-Signalwegstörung und der AD?

Die RELN-Signalkaskade spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Gehirns, z.B. durch Unterstützung der Lamination des Neokortex und Foliation des Zerebellums. Jedoch auch im adulten Gehirn greift der Signalweg in Plastizitätsprozesse wie z.B. die Synaptogenese und die Gedächtnisbildung ein.

Im Hinblick darauf, dass heutige Medikamente nur die Symptomatik und nicht die Ursache der AD behandeln bzw. erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringen, scheint es sinnvoll, über Präventivmaßnahmen nachzudenken. Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass eine Verbesserung der kognitiven Leistung und konsekutiv eine mildere Ausprägung der Krankheit durch ein sowohl pränatales als auch postnatales *Environmental Enrichment* (physische Stimulation) in der AD-Pathologie erreicht werden kann. Ferner wurden epigenetische Mechanismen über die die Eltern pränatal Informationen über Veränderungen in der Umwelt an ihre Nachkommen weitergeben können diskutiert.

Mit Hilfe eines transgenen Mausmodells sollen nun folgende Fragen beantwortet werden:

- In wie weit wird die Expression der Mitglieder des RELN-Signalweges durch pränatales bzw. postnatales *Environmental Enrichment* (Benutzung eines Laufrades) in TG-Mäusen mit AD-Pathologie beeinflusst?
- Ist der Zeitpunkt des *Environmental Enrichments* entscheidend, um eine Veränderung in der Expression der RELN-Signalkaskade herbeizuführen?
- Könnte eine Veränderung im RELN-Signalweg in Folge des pränatalen oder postnatalen *Environmental Enrichments* eine Ursache für die mildere Ausprägung der AD-Pathologie sein?
- Schließlich, könnte es in Folge einer Reprogrammierung des Epigenoms (z.B. Methylierungsstatus der Promotorregion von *Reln*) in den Nachkommen trächtiger laufender Mütter zu einer Veränderung im RELN-Signalweg kommen?

3. Methoden

3.1. Tiere/Menschen

3.1.1. Mausmodell

In dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell verwendet, das eine Doppelmutante für das humane *APP*-Gen trägt („*APP Swedish*“, K670N / 671NL sowie „*APP Indiana*“, V717F). Das Transgen steht unter der Kontrolle des Prionpromoters des syrischen Goldhamsters. In Folge der Überexpression des humanen *APP* kommt es bereits im Alter von drei Monaten zu A β -Ablagerungen. Schon nach fünf Monaten bilden sich Plaques mit einem zentralem Amyloidkern und einer Korona aus diffusen A β -Ablagerungen und einer neuritischen Pathologie (Chishti et al., 2001). Des Weiteren ist bereits ab dem dritten Lebensmonat ein Lerndefizit im *Morris Water Maze*-Test messbar (Chishti et al., 2001). Auch wenn dieses Tiermodell keine neurofibrilären Tangles bildet, so besteht ein großer Vorteil dieses Mausmodells darin, dass die Alzheimer-ähnliche Pathologie bereits in einem sehr frühen Alter ausbricht und so in einer kurzen Zeitspanne untersucht werden kann. Die Tiere sind auf einem C3H/C57Bl6-Hintergrund gezüchtet und werden im Folgenden als TgCRND8 bezeichnet.

3.1.1.1. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in transparenten Typ III Käfigen unter Standardbedingungen von 22°C (\pm 1°C) gehalten mit einem 12h Tag/Nacht-Zyklus. Futter und Wasser waren *ad libitum* verfügbar. Die Tiere wurden unter S1-Bedingungen in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gehalten. Die Tierexperimente in dem hier beantragten Projekt bedurften keine Tierversuchsgenehmigung im Sinne des §8 des Tierschutzgesetzes. Es handelte sich entweder um Tötung von Tieren ohne jegliche Vorbehandlung (§4 Abs. 3) oder um Haltung in mit einem Laufrad angereicherten Käfigen, so dass auch keine behördliche Meldepflicht vorlag. Der Tierschutzbeauftragte der Einrichtung (Dr. Martin Lücke) war über diese Untersuchungen unterrichtet. Alle Experimente wurden im Einklang mit den Tierschutzrichtlinien (86/609/EEC) durchgeführt.

3.1.1.2. Studienaufbau

3.1.1.2.1. Untersuchung der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen von Mäusen

Es wurden sowohl transgene (TG) Weibchen als auch Männchen der TgCRND8 Mauslinie und Wildtypmäuse (WT) gleichen Alters und Geschlechts untersucht (Tabelle 1). Die Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Verlaufs der AD-ähnlichen Pathologie untersucht, d.h. vor dem Auftreten der beta-Amyloid Plaques (postnatal Tag 30 = P30), in etwa synchron zum Auftreten der beta-Amyloid Plaques (P90) und in einer weit fortgeschrittenen Phase der AD-ähnlichen Pathologie (P210). Die AD-relevanten Areale (Frontalkortex [FC], Entorhinalkortex [EC] sowie Hippokampus [HC]) wurden separat analysiert.

Tabelle 1: Anzahl der TgCRND8-Mäuse für die Untersuchung der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen.

Hirnareal	Anzahl der Mäuse
Hippokampus	TG P30 = 6 TG P90 = 6-7 TG P210 = 6-7 WT P30 = 6 WT P90 = 6 WT P210 = 6
Entorhinal- und Frontalkortex	TG P30 = 6-12 TG P90 = 6-12 TG P210 = 6-12 WT P30 = 6-12 WT P90 = 6-12 WT P210 = 6-12

3.1.1.2.2. Pränatale und postnatale Stimulation in der Maus

Pränatale Stimulation

Sechs männliche TgCRND8 Mäuse wurden mit Wildtyp-Weibchen derselben Linie verpaart. Die trächtigen Weibchen, welche erst nach dem ersten erfolgreichen Wurf in die experimentelle Situation überführt wurden, wurden in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde entweder unter Standardbedingungen (*standard* Haltung, SH) oder in einem Käfig mit einem Laufrad (Laufrad, LR) gehalten (n=10, Tabelle 2). Die Laufleistung wurde mittels eines Fahrradcomputers überprüft. Vor Versuchsbeginn wurde zudem selektiert, welche der Mütter tatsächlich das Laufrad benutzten, um so diejenigen auszulesen, die das Versuchsdesign nicht nutzten. Um den Einfluss des Elterngenotyps auf die Nachkommen zu minimieren wurden für die nachfolgenden Trächtigkeitsphasen sowohl die Haltungsbedingung als auch das Männchen per Zufall vertauscht. Die weiblichen Nachkommen der Würfe wurden in vier Gruppen nach Genotyp (TG, WT) und Haltungsbedingung der Mütter (mSH, mLR) aufgeteilt. Die Nachkommen wurden bis zum Zeitpunkt P150 in Gruppen von zwei bis fünf Wurfgeschwistern in der *standard* Haltung gehalten (Tabelle 2).

Postnatale Stimulation

Zur Untersuchung des Einflusses postnataler Stimulation auf die Reelin-Signalkaskade wurden Proteinproben einer unabhängigen und bereits veröffentlichten Studie untersucht (Herring et al., 2011). Sowohl weibliche TG als auch WT Tiere von WT Müttern, die in SH gehalten aufwuchsen, wurden einer *enriched* Haltung (EH) ausgesetzt (Tabelle 2). Das heißt, dass die Jungen zwischen dem Zeitpunkt P30 bis P150 die Möglichkeit hatten verschiedene physisch und kognitiv stimulierende Gegenstände zu nutzen.

Tabelle 2: Prä- und postnatale Stimulation.

WT- Wildtyp Maus, TG- transgene Maus; m- maternal; LR- Laufrad, EH- *enriched* Haltung, SH- *standard* Haltung.

Haltung des Muttertiers (WT)	Nachkommen (WT + TG)	Anzahl der Mäuse	Bezeichnung in Studie
mSH	SH	TG = 8; WT = 9	mSH
mLR	SH	TG = 6; WT = 9	mLR
mSH	EH	TG = 6, WT = 8	EH

3.1.2. Mensch

Für die Untersuchungen an menschlichen Gehirnproben wurde autopsisch gewonnenes *post mortem* Gewebe aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Münster verwendet. Das positive Votum der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der medizinischen Fakultät der Universität Münster lag vor (Reg. #1IIIIPau). Der Grad der AD wurde von zwei Neuropathologen nach den Kriterien von CERAD und Braak & Braak bestimmt (Braak and Braak, 1991; Mirra et al., 1991, Mirra et al., 1993).

Für die immunhistochemischen Experimente wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Hirngewebe von AD-Patienten klassifiziert als CERAD A/Braak & Braak I-II, CERAD B/Braak & Braak III-IV und CERAD C/Braak & Braak V-VI, sowie zur Kontrolle Patienten gleichen Alters (Kontrolle Alt, KA) und junger Patienten (Kontrolle Jung, KJ) ohne neuropathologische Veränderungen untersucht (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl der humanen Fälle für die immunhistochemischen Untersuchungen von RELN in AD-relevanten Hirnarealen.

Gruppe	Durchschnitts- alter	SD (±)	Fallzahl
KJ	33,2	6,28	14
KA	73	1,79	11
CERAD A/Braak I-II	76,71	5,23	17
CERAD B/Braak III-IV	80,18	5,58	15
CERAD C/Braak V-VI	78,69	9,68	16

Für Western blot- und *TaqMan*-Untersuchungen wurde tiefgefrorenes Hirngewebe von AD-Patienten, die CERAD C/Braak & Braak V-VI klassifiziert wurden, sowie als Kontrolle KA und KJ analysiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl der humanen Fälle für die Western blot- und *TaqMan*-Untersuchungen der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen.

Gruppe	Durchschnitts- alter	SD (\pm)	Fallzahl	<i>Post mortem</i> - Zeit	SD (\pm)
Kontrolle Jung	30,67	7,97	6	31,33	27,30
Kontrolle Alt	65,60	8,72	10	28,50	11,23
CERAD C/Braak V-VI	79,71	6,26	7	24,08	13,79

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Genotypisierung

3.2.1.1. Lyse von murinen Ohrbiopsien

Die Genotypisierung der TgCRND8-Mäuse fand am 21. Lebenstag statt. Die Mäuse wurden mittels Isofluran (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) kurzfristig betäubt. Mit einer Schere wurde ein ca. 9mm² großes Stückchen von Rand des Ohres der Mäuse entfernt und in einem fertigen Lysispuffer (DirectPCR Lysis Reagent [Tail], Viagen Biotech, Inc., Los Angeles, CA, USA) mit Proteinase K (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) versetzt. Die Lyse des Gewebes fand bei 55°C über Nacht statt. Die Proteinase K wurde dann bei 85°C für 45min inaktiviert. Das fertige Lysat wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung

Tabelle 5: Puffer/ Komponenten für die Agarosegel-Elektrophorese zur Genotypisierung.

Puffer/ Komponenten	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2M Tris 5,7% Eisessig (v/v) 50mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8.0
DNA-Ladepuffer	6,3mM Bromphenolblau 50% Glycerol 50% dH ₂ O
DNA Ladder 100bp	New England Biolabs, Ipswich, USA

Das doppelt mutante *APP*-Gen besitzen nur die transgenen Mäuse (*APP* +/-). Zur Verifizierung des Genotypes wurde für alle Mäuse eine PCR für die Promotorregion des mutanten *APP*- und das *Gapdh*-Gen, als interne Positivkontrolle, durchgeführt. Bei jeder PCR wurde als externe Positivkontrolle DNA einer *APP* +/- Maus mitgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung.

Primername	Gensequenz 5'-3'
<i>Gapdh se</i>	CCTTCATTGACCTCAACTACATGGT
<i>Gapdh as</i>	TCATTGTCATACCAGGAAATGAGCT
DW 191 h-APP	GGCCGCGGAGAAATGAAGAAACGCCAAGCGCCGTGA
DW 229 h-APP	TGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAA

Zu Beginn wurde ein PCR-Mix zusammenpipettiert (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 7: PCR-Mix für die Genotypisierung.

Komponenten	Volumen (µl)
ddH ₂ O	12,3
MgCl ₂	2,4
dNTPs (2,5 mM)	2,5
10x PCR-Puffer	2,5
<i>APP Primer forward</i>	1
<i>APP Primer reverse</i>	1
<i>Gapdh Primer forward</i>	1
<i>Gapdh Primer reverse</i>	1
Taq-Polymerase	0,3

Zu dieser Lösung wurde 1µl *template* DNA gegeben. Die PCR fand unter folgenden Bedingungen im Thermocycler statt (Tabelle 8).

Tabelle 8: PCR-Programm für die Genotypisierung.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1	3min	94
2	20sec	94
3	20sec	66
4	1min	72
Schritt 2-4 34x wiederholen		
5	10min	72

Das PCR-Produkt wurde mit einem DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen (Tabelle 5). Die Elektrophorese lief für ca. 40min bei 130V. Anschließend wurden die Amplifikate unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.2. Gewebeisolierung

3.2.2.1. Murines Hirngewebe

Zu den Zeitpunkten P30, P90, P150 und P210 wurden die Mäuse dekapitiert. Danach wurde aus einer Hemisphäre der frontale und entorhinale Kortex sowie der Hippokampus präpariert, sofort mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Protein- und RNA-Isolierung aus den einzelnen Arealen wurden daraufhin mithilfe des TRIzol® reagent durchgeführt

Die zweite Hemisphäre des Gehirns wurde in 4% gepuffertem Formaldehyd für 24h fixiert. Nach dem Fixieren wurde die Hemisphäre koronal in drei Teile geschnitten. Das Kleinhirn wurde vom Großhirn getrennt. Das Großhirn wurde halbiert.

Zur Einbettung des fixierten Gewebes wurde dieses in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin gegeben (Tabelle 9).

Tabelle 9: Entwässerungsprotokoll für formaldehydfixiertes Gewebe.

Komponente	Zeit (h)	Temperatur	
70% EtOH	1:00	RT	Vakuum
90% EtOH	0:45		
90% EtOH	1:00		
96% EtOH	1:40		
96% EtOH	1:15		
96% EtOH	1:00		
100% EtOH	1:30		
100% EtOH	1:40		
Xylol	1:15		
Xylol	1:15		
Paraffin	0:45	60°C	
Paraffin	0:45		
Paraffin	0:45		
Paraffin	0:55		

Die behandelten Gewebestückchen einer Probe wurden in einem Block mit dem nach frontal zeigenden Teil des Hirngewebes nach unten gerichtet positioniert und mit Paraffin aufgegossen.

3.2.2.2. Humanes Hirngewebe

Aus humanen tiefgefrorenen koronalen Scheiben einer Hemisphäre des Gehirns wurde vom *Gyrus frontalis medius*, vom Entorhinalkortex und vom Hippokampus auf Höhe des *Uncus* jeweils 1cm³ Gewebe entnommen und für die Protein- und RNA-Extraktion mittels TRIzol® reagent genutzt.

Des Weiteren lagen formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebe der Areale Frontal- und Entorhinalkortex sowie Hippokampus für die Analyse vor. Die Lokalisation der Hirnareale wurde analog zu den tiefgefrorenen humanen Proben gewählt.

3.2.3. TRIzolextraktion Maus und Mensch

Tabelle 10: Puffer für die TRIzolextraktion.

Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
Guanidinhydrochloridlösung	300mM Guanidinhydrochlorid 95% Ethanol

Die Extraktion von RNA und Proteinen erfolgte mittels TRIzol® *reagent* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

Murine und humane Proben wurden in flüssigem Stickstoff bis zur Homogenisierung gelagert. Zur Homogenisierung der Proben wurde ein Mikrodismembrator (Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Das Schüttelgefäß sowie ein Spatel und eine Pinzette wurden für jede neue Probe mit RNaseZap® *Solution* (Ambion Inc., Austin, TX, USA) behandelt.

Das Unterteil des Schüttelgefäßes wurde für 6sec im flüssigen Stickstoff gekühlt. Sofort darauf wurden 800µl des TRIzol® *reagent* in das Unterteil pipettiert und die Probe dazugegeben. Das Oberteil des Schüttelgefäßes, samt Kugel, wurde ebenfalls für 6sec im flüssigen Stickstoff gekühlt. Nach Verschluss des Schüttelgefäßes wurde die Probe für 2min bei 2500rpm homogenisiert. Die cremige Masse wurde mit einem Spatel aus dem Gefäß in ein 2ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und weitere 800µl TRIzol® *reagent* dazugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden zu der Probe 200µl Chloroform dazugegeben. Die Zentrifugation erfolgte, nach ausreichendem Vermischen der Probe mit Chloroform, bei 4°C, für 15min bei 13000rpm. Auf Grund des Chloroforms kam es zu einer Phasenbildung. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA, in der weißlichen Interphase die DNA und in der unteren Phenol-Phase die Proteine. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, die Inter- und Phenol-Phase wurden bis zu Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Für eine saubere Trennung von RNA und DNA wurde die obere wässrige Phase mit weiteren 500µl TRIzol® *reagent* versetzt. Daraufhin wurde der Probe nach 5-minütiger Inkubation 100µl Chloroform zugegeben und die Probe gut gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation bildeten sich abermals die Phasen aus. Die obere klare Phase wurde abgenommen und in ein neues 2ml RNase-freies Reaktionsgefäß

überführt. Die beiden anderen Phasen konnten verworfen werden. Zur Fällung der RNA in der wässrigen Phase wurde 800µl Isopropylalkohol verwendet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 4°C für mindestens 30min bei 13000rpm entstand ein RNA-Pellet. Dieses Pellet wurde zwei Mal mit 80%igem Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen (Zentrifugation bei 4°C für 5min bei 13000rpm). Das gewaschene RNA-Pellet wurde über Kopf bei Raumtemperatur getrocknet, in 20µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Die zuvor abgenommene Inter- und Phenolphase wurde mit 480µl 100%igem Ethanol versetzt, gut gemischt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C für 5min bei 5000rpm. Der Überstand mit den Proteinen wurde in zwei neue 2ml RNase-freie Reaktionsgefäße zu gleichen Teilen aufgeteilt. Das DNA-Pellet wurde bei -80°C gelagert.

In beide 2ml Reaktionsgefäße wurde jeweils 1,2ml Isopropanol gegeben und die Probe gut vermischt. Nach der Ausflockung der Proteine für 10min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C für 10min bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Drei Mal hintereinander wurde das Pellet mit einer 0,3M Guanidinhydrochloridlösung (Tabelle 10) gewaschen und 20min darin inkubiert (Zentrifugation bei 4°C für 5min bei 10000rpm). Das so gewaschene Proteinpellet wurde für jede Probe in ein Reaktionsgefäß zusammengeführt, mit Hilfe einer Kanüle zerkleinert und auf dem Heizblock bei 40°C getrocknet. Die Proteine wurden jeweils in 600-1200µl 1%iger SDS-Lösung (w/v) gelöst. Das Protein wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.4. DNase-Behandlung und Aufreinigung der murinen RNA

Die RNA wurde mit DNase (Quiagen RNeasy Mini Kit, Quiagen, Hilden) behandelt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Pipettiermix für DNase-Behandlung.

Komponente	Volumen (µl)
RDD-Buffer	10
DEPC-H ₂ O	67,5
DNase	2,5

Anschließend wurde die RNA durch Filtrierung gesäubert und in 30µl DEPC-H₂O aufgenommen (RNase Mini Kit, Quiagen). Die RNA wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.5. Quantitative und qualitative Bestimmung der RNA

Tabelle 12: Puffer zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der RNA-Menge.

Puffer	Zusammensetzung
10 x MOPS-Puffer	220mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) 13mM Natriumacetat, pH 7.0 0,2mM EDTA, pH 8.0
RNA-Probenmix	33mM MOPS 1,95mM Natriumacetat 0,03mM EDTA (pH 8.0) 7,50% Formaldehyd (v/v) 50% Formamid (v/v) 0,01ng Ethidiumbromid
Agarosegel (1 %)	1% Agarose (w/v) 22mM MOPS 1,3mM Natriumacetat, pH 7.0 0,02mM EDTA, pH 8.0 6,7% Formaldehyd (v/v)
RNA-Ladepuffer	0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol 1mM EDTA, pH 8.0 49,6% steriles Glycerin (v/v) 49,6% DEPC-H ₂ O (v/v)

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg). Zur qualitativen Bestimmung der RNA wurden die Proben in einem RNA-Probenmix und RNA-Ladepuffer aufgenommen und in einem 1%igem

Agarosegel aufgetrennt (Tabelle 12). Der Gellauf erfolgte bei ca. 120V für 30min in einem 1fach MOPS-Puffer. Anschließend wurde das Gel fotografisch dokumentiert.

3.2.6. Quantitative *real-time* PCR (TaqMan-assay)

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulierung von Reelin wurde eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt. Dafür wurde die bei der Extraktion gewonnene RNA von Maus und Mensch in cDNA umgeschrieben. Nach Prüfung der Qualität der cDNA wurde der TaqMan-assay für Reelin gemessen.

3.2.6.1. cDNA-Synthese

Das Umschreiben der RNA wurde nach Protokoll des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Zu Beginn wurde ein 2fach Mastermix für die cDNA-Synthese zusammenpipettiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: 2x Mix für die cDNA-Synthese.

Komponenten	Volumen (µl)
10x RT Buffer	2
25x dNTPs (100mM)	0,8
10x RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor N808-0119	1
Nuclease-free H2O/DEPC H2O	3,2

Für jedes Individuum wurden 2µg RNA umgeschrieben (Tabelle 14).

Tabelle 14: PCR-Programm für cDNA-Synthese.

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	10	25
2	120	37
3	5	85

Die Qualität der cDNA wurde mittels konventioneller PCR für das *Gapdh*-Gen überprüft. Bei jeder PCR wurde eine cDNA als Positivkontrolle und eine RNA-Probe als Negativkontrolle mitgeführt (Tabelle 15).

Tabelle 15: PCR-Mix für Qualitätskontrolle der cDNA.

Komponenten	Volumen (µl)
MgCl ₂	2,4
dNTPs (2,5 mM)	2,5
10x PCR-Puffer	2,5
<i>Gapdh</i> Primer forward	1
<i>Gapdh</i> Primer reverse	1
Taq-Polymerase	0,3

Pro Individuum wurde 1µl der cDNA eingesetzt und *Gapdh* im Thermocycler amplifiziert (Tabelle 16).

Tabelle 16: PCR-Programm für Qualitätskontrolle der cDNA.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1	3min	95
2	30sec	94
3	1min	60
4	45sec	72
Schritt 2-4 24x wiederholen		
5	10min	72

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit einem DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Elektrophorese lief für ca. 40 Minuten bei 130V. Nach dem Gellauf wurden die Amplifikate unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.6.2. Durchführung der quantitativen *Real-time* PCR

Das Expressionsniveau von *Reln* wurde anhand der cDNA ermittelt. Dafür wurde jede murine und humane Probe im Triplikat gemessen. Um das relative

Expressionsniveau zu ermitteln wurde eine Standardreihe, bestehend aus fünf Verdünnungsstufen, mitgeführt. Die Standardreihe setzte sich aus einem Pool aller bei einem Lauf gemessenen Proben zusammen. Zur Normalisierung der Daten wurde für jede Probe, ebenfalls im Triplikat und mit Standardreihe gemessen, das Niveau der Expression von *Gapdh* gemessen (Tabelle 17).

Tabelle 17: PCR-Mix für *Real-time*-PCR.

Komponente	Volumen (µl)
Gen	<i>Gapdh/Reln</i>
TaqMan Mastermix	12,5
DEPC-H ₂ O	7,75
Primer forward	0,75
Primer reverse	0,75
Sonde	1,25

Zu dem Master-Mix wurde 1µl cDNA (Probenmessung) beziehungsweise 2µl cDNA der jeweiligen Verdünnungsstufe (Standardreihe) gegeben. Die Probenansätze wurden in ein Thermocycler mit angeschlossener CCD-Kamera gestellt (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) (Tabelle 18).

Tabelle 18: *Real-time*-Programm.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1	2min	50
2	10min	95
3	40x 15sec	95
4	1min	60

Die relative Quantifizierung der *Real-time*-PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

3.2.7. Hypermethylierungsanalyse

Mit Hilfe selektiver Basen-Konversion der DNA durch Natriumhydrogensulfit ist es möglich, die Methylierung einzelner Abschnitte des Genoms zu studieren. Hierfür

macht man sich die Eigenschaft des Natriumhydrogensulfits zu Nutze, Cytosin-Reste in Uracil umzuwandeln. Methylierte Cytosine (5-Methyl-Cytosin) bleiben dagegen unverändert im Genom erhalten (Hayatsu et al., 1970; Wang et al., 1980). Bei einer nachfolgenden Amplifikation der DNA mittels PCR wird das umgewandelte Uracil als Thymin und das 5-Methyl-Cytosin weiterhin als Cytosin abgelesen. So ist es möglich, durch Methylierung veränderte DNA-Abschnitte bei einer Sequenzierung nach Sanger nachzuweisen.

3.2.7.1. DNA-Isolierung

Aus paraffineingebettetem Gewebe wurden der Neokortex und der Hippokampus isoliert und mittels QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden) die DNA nach Protokoll gewonnen. Dafür wurden das Gewebe mit ATL Puffers und mit Proteinase K versetzt und über Nacht bei 56°C auf einem Thermoschüttler lysiert. Nach der Lyse wurden nochmals ATL Puffer zur Probe zugegeben.

Zur besseren Bindung der DNA an die Säule, wurde jede Probe mit AL Puffer und Ethanol vermischt. Die Probe wurde in einen QIAamp MinElute Filter (Qiagen, Hilden) überführt und abzentrifugiert. Die gebundene DNA nacheinander mit AW1 und AW2 Puffer gewaschen.

Die so gereinigte DNA wurde in 20µl AE Puffer aufgenommen und bei -80°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

3.2.7.2. Natriumhydrogensulfitkonvertierung

Tabelle 19: Puffer für die Natriumhydrogensulfitkonvertierung.

Puffer	Zusammensetzung
Natriumhydrogensulfitreagenz	2,81M Hydrochinon 2,79g Natriummetabisulfite 630mM NaOH

Von der aufgereinigten DNA wurden 2µg mit einer 3M NaOH-Lösung versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 2min bei 95°C wurde die behandelte DNA sofort auf Eis gestellt. Zu der Probe wurde die Natriumhydrogensulfitreagenz (Tabelle 19) zugegeben und für 16-20h bei 50°C im Dunkeln inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben mit Hilfe des Wizard® DNA Clean-Up Kits (Promega Corporation, Madison, WI, USA) aufgereinigt. Die Probe wurde dafür mit Wizard® DNA Clean-Up Resin versetzt und abgesaugt. Die auf der Säule gebundene DNA wurde danach mit 80%igem Isopropanol gewaschen. Die DNA wurde in 50µl 65°C warmen Wassers eluiert. Dem Eluat wurde 3M NaOH zugesetzt. Nach 15min Inkubation bei 37°C wurden zur Probe 6M Ammoniumacetat (pH 7,0), Glycogen und 100%igem EtOH zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in einem Heizblock getrocknet. Die DNA wurde in 30µl AE-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.7.3. Methylierungs-PCR

Tabelle 20: Primer für die Methylierungs-PCR
(Sequenz der Sequenzierprimer in rot markiert).

Genname	Primersequenz 5'-primer (<i>forward</i>) 3'-primer (<i>reverse</i>)
<i>Reln</i> , NT_165760	CTTGCTTCCTGGCACGAG GTAGTTAGGTTGAAAGGGAGATTG CAGGAAACAGCTATGAC CCACCCCAATAACAATAATCATAC
<i>Reln</i> , NT_165760	CTTGCTTCCTGGCACGAG GGTAGTTAGGTTGAAAGGGAGATT CAGGAAACAGCTATGAC CCACCCCAATAACAATAATCATAC
<i>Reln</i> , NT_165760	CTTGCTTCCTGGCACGAG ATTTTTTATTAATTTTGTTTTTTTT CAGGAAACAGCTATGAC AAATACTCATTTCCCTACACATTAC

Die aufgereinigte DNA wurde in zwei identischen PCR's amplifiziert (Tabelle 21 und Tabelle 22). Die erste PCR erfolgte zuerst mit einem Primerpaar, das die methylierten Sequenzen erkennen konnte, die zweite PCR mit einem Primerpaar, das die unmethylierten Sequenzen erkennen konnte (Tabelle 20).

Tabelle 21: PCR-Mix für die Methylierungs-PCR.

Komponente	Volumen (µl)	
	Primer für methylierte Sequenz	Primer für unmethylierte Sequenz
10x Puffer	2,5	2,5
MgCl ₂	2,5	2,5
dNTPs	0,5	0,5
Primer <i>forward</i>	0,5	0,5
Primer <i>reverse</i>	0,5	0,5
10%Dimethylsulfoxid (DMOS)	-	2,5
AmpliTaq Gold	0,25	0,25

Zu den PCR-Ansätzen wurden je 3 µl natriumhydrogensulfitbehandelte DNA hinzugefügt. Das verwendete Programm ist Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: PCR-Programm für die Methylierungs-PCR.

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	5min	95
2	20sec	95
3	1min	63 – 0,5 je Zyklus
4	1min	72
Schritt 2-4 15x wiederholen		
5	20sec	95
6	1min	56
7	1min	72
Schritt 5-7 35x wiederholen		
8	2min	72

Als Qualitätskontrolle für die Methylierungs-PCR wurde ein Teil des PCR-Produkt auf ein 2,5%iges Agarosegel mit 1%igem Etidiumbromid geladen und das Gel bei 120V für etwa 30min laufen gelassen.

Nachfolgend wurde das verbliebene PCR-Produkt mittels MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Bei Zugabe von 5 Volumen PB Puffer zu 1 Volumen PCR-Produkt verfärbte sich die Mischung gelb (pH-Indikator, um Bindung der DNA an Filter zu verbessern). Ein MinElute Filter wurde in einem Auffangröhrchen platziert und die Mischung in den Filter gegeben. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Durchfluss verworfen und der Filter mit 750µl PE Puffer gewaschen. Es wurde erneut für 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die DNA wurde in 10µl EB Puffer aufgenommen und nach 1min Inkubation bei RT erneut für 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -80°C gelagert.

3.2.7.4. **Cycle Sequencing und Sequenzierung**

Das *Cycle Sequencing* wurde mit Hilfe des BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Tabelle 23: *Cycle Sequencing*-Mix.

Komponente	Volumen (µl)
BigDye	2,0
5x Puffer	3,0
Primer	3,2

Für das *Cycle Sequencing* wurde 1µl des aufgereinigten PCR-Produktes in den *Cycle Sequencing*-Mix eingesetzt. Das *Cycle Sequencing* wurde mit Hilfe des BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt (Tabelle 23). Als Primer wurden Abschnitte aus den Primersequenzen der Methylierungs-PCR genutzt (in rot markiert, Tabelle 20). Das Programm für das Cycle Sequencing wird im Folgenden dargestellt (Tabelle 24):

Tabelle 24: *Cycle Sequencing*-Programm.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)
1	5min	95
2	30sec	95
3	10sec	55
4	4min	60
Schritt 2-4 50x wiederholen		

Nach dem *Cycle Sequencing* wurde die Probe mittels Ethanolfällung aufgereinigt und die DNA in 10µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgenommen. Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Sequencher Software (Version 4.10, Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA).

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des murinen und humanen Proteingehalts in einer Probe wurde mittels DCTM Protein Assay Kit II gemessen. Diese Methode basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951). Für die Untersuchung wurde ein BSA-Standard mit den Konzentrationen von 0,125 bis 2 mg/ml mitgeführt. Die photometrische Messung wurde im Multiskan®FC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei 750nm durchgeführt.

3.3.2. Western blot und Immundetektion

3.3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tabelle 25: Puffer/Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Standard Lysispuffer	10mM Tris/HCl, pH 8.0 150mM NaCl 2% Igepal 1% Na-Desoxycholat 1mM EDTA 1mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)
Trenngel (10% oder 12,5%)	375mM Tris 0,10% Natriumdodecylsulfat (SDS, w/v) 0,08% Ammoniumperoxodisulfat (APS, w/v) 0,14% N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED, v/v) pH 8.0
Sammelgel (5%)	125mM Tris 0,10% SDS (w/v) 0,08% APS (w/v) 0,2% TEMED (v/v) pH 6.8
5x Auftragspuffer	60mM Tris, pH 6.8 10% Glycerol 2% SDS (w/v) 5% beta-Mercaptoethanol (v/v) 0,05% Bromphenolblau (w/v)

10 x SDS-Laufpuffer	1,92M Glycin 322mM Tris 66mM SDS
Proteinmarker	Prestained protein ladder (10-230kDa), New England Biolabs

Die Proteinproben wurden mit einem 5fach Auftragspuffer versetzt, mit einem Standard Lysispuffer auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und für 5min bei 95°C denaturiert. Zum Auftrennen der Proben wurde ein Gel mit 4%igem Sammel- und 10- (für APOER2) oder 12,5%igem Trenngel (für VLDLR) gegossen (Tabelle 25). Die Elektrophoresedauer betrug ca. 1-1,5h bei 130 V in einem 1x SDS-Laufpuffer.

3.3.2.2. Lineare Gradientengelelektrophorese

Tabelle 26: Puffer/ Lösungen für die lineare Gradientengelelektrophorese.

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Gradientengel (4% und 12%)	375mM Tris, pH 8.8 0,05% APS (w/v) 0,05% TEMED (v/v)
10x Tris-glycin SDS Running Buffer	1,92M Glycin 239mM Tris 35mM SDS
Proteinmarker	Prestained protein ladder (10-230kDa), New England Biolabs

Zur Auftrennung von RELN und DAB1 wurde ein 4-12%iges lineares Gradientengel mit Hilfe eines Gradientformers (485 Gradient Former, Bio Rad, München) und einer Multicasting Chamber (Mini-PROTEAN 3 Multi-Casting Chamber, Bio Rad, München) hergestellt. Die Proteinproben wurden mit einem 5fach Auftragspuffer versetzt und einem Standard Lysispuffer auf das gewünschte Volumen aufgefüllt, aber nicht denaturiert (Tabelle 26). Die Auftrennungsdauer lag bei ca. 1,5h bei 130V in einem 1x Tris-Glycin SDS Running Buffer.

3.3.2.3. Blotting

Tabelle 27: Puffer/ Lösungen für das Blotting.

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Blotpuffer (für SDS-Gelelektrophorese)	192mM Glycin 25mM Tris 20% Methanol
25x Glycin-Transfer-Buffer (für Lineare Gradientengele)	1,2M Glycin 150mM Tris
Ponceau-Lösung (0,5% Stock)	0,7mM Ponceau S 1% Eisessig

Die bei der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mittels *Wet-Blot* auf die Nitrozellulosemembran (Protran Nitrocellulose Membrane Filters, Whatman, Porengröße 0,20µm, VWR International GmbH, Darmstadt) übertragen (Tabelle 27). Der Transfer wurde bei 130V und 0,25A (konstant) für 1 bis 1,5h durchgeführt.

3.3.2.4. Proteindetektion

Tabelle 28: Lösung für die Proteindetektion.

Lösung	Zusammensetzung
5% Magermilchlösung	5% Magermilchpulver (w/v) in 1x TST

Tabelle 29: Primärantikörper für Maus und Mensch.

WB – Western blot, IH - Immunhistochemie

Bezeichnung	für	Konzentration	Klon/Artikelnummer/ Firma	MW in kDa	Spezies
anti- RELN	Maus (G10) WB IH	1:500 1:100	G10, MAB5364, Millipore, Billerica, MA, USA	420, 310 & 180	Maus
	Mensch (MAB142) WB IH	1:250 1:1000	MAB142, MAB5366, Millipore, Billerica, MA, USA	420, 310 & 180	Maus
anti- APOER2	Maus	1:100	ab52905, abcam, Cambridge, UK	~110 & 130	Kaninchen
	Mensch	1:500	ab62659, abcam, Cambridge, UK		Kaninchen
anti- VLDLR	Maus	1:125	AF2258, R&D Systems, Minnea- polis, MN, USA	~140 & 160	Ziege
	Mensch	1:125	sc-18824, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA		Maus
anti- DAB1	Maus	1:2000	D1569, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	~80	Kaninchen
	Mensch	1:1000			
Anti- beta- Aktin	Maus/ Mensch	1:15000	A5441, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	42	Maus
Anti- beta- Amyloid	Maus/ Mensch IH	1:100	6F/3D, Dako Deutschland GmbH		Maus

Tabelle 30: Sekundärantikörper für Maus und Mensch

Bezeichnung	Firma	Spezies
Anti-Maus	A3682, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	Ziege
Anti-Maus	A0168, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	Ziege
Anti-Kaninchen	111-035-005, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA	Ziege
Anti-Ziege	A9452, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	Maus

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten eine unspezifische Proteinfärbung mittels Ponceau S (Tabelle 27) durchgeführt.

Unspezifische Bindungsstellen für Antikörper wurden mit einer 5%igen Magermilchlösung (Tabelle 28, Fluka, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) für 30-60min abgesättigt. Die Membranen wurden anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper in der Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 29).

Nachdem die Membran 3-mal für jeweils 10min gewaschen wurden, wurde sie die erneut mit Magermilchlösung blockiert und mit dem passenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur versetzt (Tabelle 30). Danach folgte ein weiterer Waschschrift (3x10min).

Die gesuchten Proteine wurden durch Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe der ECL-Reaktion detektiert. Die so entstandenen Daten wurden mit dem ChemiDoc XRS Dokumentationssystem (Bio Rad, München) digitalisiert.

Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde beta-Aktin verwendet (Tabelle 29 und Tabelle 30).

3.3.3. Immunhistochemie

Von jeder Maus wurden 2µm dicke sagittale Schnitte des Hippokampus und 2µm dicke koronale Schnitte für den Entorhinal- und den Frontalkortex mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt und auf SuperFrost®Plus Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) aufgezogen. Aus einem

12stündigen Trocknungsschritt bei 37°C konnten die Schnitte für die nachfolgenden Färbungen verwendet werden.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und anschließend mit einer Target Retrieval Solution (pH 9, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) für 30min bei 95°C vorbehandelt und automatisiert (Dako Autostainer, Dako Deutschland GmbH) mit einem anti-Reelin Antikörper gefärbt.

Von jedem untersuchten Hirnareal des Menschen wurden 6µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt und auf Flex IHC Objektträger (Dako Deutschland GmbH) aufgezogen. Nach einem zweitägigen langen Trocknungsschritts bei 37°C konnten die Schnitte für die nachfolgenden Färbungen verwendet werden.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und für 35min bei 95°C mit einer Target Retrieval Solution (pH 6.1, Dako Deutschland GmbH) vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte automatisiert (Dako TechMate™ Instruments, Dako Deutschland GmbH) mit einem anti-Reelin Antikörper gefärbt.

Für die beta-Amyloid-Färbung von Maus und Mensch wurden die Hirnschnitte für 3min mit 85%iger Ameisensäure behandelt und danach automatisiert mit einem beta-Amyloid-Antikörper gefärbt.

Sowohl für die murinen als auch die humanen Schnitte wurden im Weiteren mit einem Sekundärantikörper inkubiert und danach mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), als Chromogen, behandelt. Für Reelin handelte es sich um einen biotinylierten anti-Kaninchen/Maus und für beta-Amyloid um einen HRP-gekoppelten anti-Kaninchen/Maus Sekundärantikörper. Zur Färbung der Zell- und Gewebestrukturen wurden die Gewebeschnitte mit einer Hämatoxylinlösung behandelt. Im Anschluss wurden die Schnitte durch eine ansteigende Alkoholreihe geführt, in Xylol überführt und mit einem Eindeckmedium und einem Deckgläschen dauerhaft konserviert.

3.3.4. Histochemie

Zur Sichtbarmachung von amyloiden Strukturen wurde eine Thioflavin-Färbung durchgeführt. ThioflavinS bindet an amyloide Fibrillen (z.B. beta-Amyloid-Plaques) und kann nach der Bindung mittels speziellen Fluoreszenzfilters unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Murine und humane Hirnschnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und anschließend für jeweils 5min erst in eine 1%ige

ThioflavinS- (w/v) und danach in einer 70%igen Ethanollösung inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden durch eine ansteigende Alkoholreihe geführt, in Xylol überführt und mit einem Eindeckmedium und einem Deckgläschen dauerhaft konserviert. Die Schnitte wurden im Dunkeln gelagert.

3.4. Morphometrische Auswertung

Zur Quantifizierung der RELN-positiven Zellen wurden je Maus und Hirnareal sechs Schnitte untersucht. Aus den seriell angefertigten Schnitten pro Maus wurde jeder zehnte Schnitt ausgesucht. Die Auszählungen wurden geblindet durchgeführt. Die Auszählung wurde mittels Lichtmikroskop und *Stereo Investigator* Software durchgeführt. Es wurden die Gesamtanzahl aller Pyramidenzellen und die Anzahl der RELN-positiven Pyramidenzellen bestimmt. Innerhalb des murinen Hippokampus wurde das pyramidale Zellband der Region *Cornu ammonis* (CA) 1 zu CA4 bei einer 200fachen Vergrößerung untersucht (Zählrahmen und Rastergröße jeweils 500 x 500µm). Die Auszählung des Frontal- und Entorhinalkortex geschah ebenfalls bei 200facher Vergrößerung (Zählrahmen und Rastergröße jeweils 500 x 500µm).

Zur Quantifizierung der RELN-positiven Zellen in humanen Proben, wurden je Patient und Hirnareal sechs Schnitte untersucht. Analog zur Maus wurde ebenfalls jeder zehnte Schnitt untersucht, die Untersuchung fand geblindet statt. Innerhalb des humanen Hippokampus wurde das pyramidale Zellband der Region CA1 zu CA4 bei einer 100fachen Vergrößerung untersucht (Zählrahmen und Rastergröße jeweils 500 x 500µm). Die Auszählung des Frontal- und Entorhinalkortex geschah bei 200facher Vergrößerung (Zählrahmen 500 x 500µm und Rastergröße 1000 x 500µm). Nur Zellen mit einer typischen neuronalen Morphologie und sichtbarem Nukleolus wurden in die Zählung einbezogen. Die gewonnenen Daten wurden als Prozentsatz der RELN-positiven Zellen in Relation zu den gesamten Pyramidenzellen ausgedrückt.

Für die Quantifizierung der RELN-positiven Ablagerungen bei Maus und Mensch in den unterschiedlichen Arealen wurde der gesamte vorliegende Schnitt abgesucht (Maus bei 100facher und Mensch bei 40facher Vergrößerung; Zählrahmen und Rastergröße jeweils 500 x 500µm). Die Ergebnisse wurden als Anzahl der RELN-positiven Ablagerungen in Relation zur untersuchten Arealgröße ausgedrückt (n/cm²).

3.5. Statistik

Weibliche und männliche Individuen wurden zusammengezählt und als Mittelwert \pm Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Kolmogorow-Smirnow-Test und die Homogenität der Varianz wurde mit dem Levenetest untersucht. Normal verteilte Datensätze wurden mittels zweifaktorieller *Analysis of variance* (ANOVA) innerhalb der Gruppen Genotyp (WT, TG), Geschlecht und Alter (P30, P90, P210) verglichen. Als *post hoc* Test zur Bestimmung der paarweisen Unterschiede wurde eine *Fisher's least significant difference* (LSD)-Analyse durchgeführt. Nicht-parametrische Daten wurden via Mann-Whitney U-Test analysiert. Alle Tests wurden mit Hilfe der SPSS Software (SPSS Statistics 17.0, SPSS Inc., Stanford, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden erst ab einem p -Wert $<0,05$ als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Expressionsmuster der RELN-Signalkaskade in AD-relevanten Hirnarealen von Maus und Mensch

4.1.1. RELN-Expression in AD-relevanten Hirnarealen der Maus

Weibliche und männliche Mäuse beider Genotypen (WT und TG) und aller Altersgruppen wurden separat auf die Expression der Mitglieder des RELN-Signalwegs untersucht. Es ergab sich, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Expressionsmuster hat. Deshalb wurden beide Geschlechter nachfolgend zusammengefasst analysiert.

4.1.1.1. Reduzierte Expression von RELN ist ein frühes Phänomen in TG-Mäusen

Zur Untersuchung des Einflusses der A β -Pathologie und des Alters auf die RELN-Expression wurden Western blot-Analysen von AD-relevanten Arealen in transgenen und Wildtypmäusen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (postnatal Tag [P] 30, 90 und 210 Tage) durchgeführt.

Das ursprünglich 420 kDa große RELN (*full length*, RELN FL) wird unter anderem zu einem ~300 kDa (RELN 300) und einem 180 kDa Fragment (RELN 180) proteolytisch gespalten.

Im Hippokampus war das durchschnittliche Level von RELN 180 in den transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen reduziert (TG vs. WT: -28%, $F_{1, 31} = 7,73$, $p = 0,013$). Außerdem konnte eine altersabhängige RELN-Reduktion beobachtet werden ($F_{2, 30} = 12,44$, $p = 0,001$). Im Hippokampus der transgenen Mäuse war bereits vor Auftreten der A β -Pathologie (P30) das RELN-Level im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen signifikant abgesenkt (TG P30 vs. WT P30: -25%, $F_{5, 27} = 7,22$, $p = 0,047$). Zudem nahm das Expressionslevel von RELN mit zunehmendem Alter noch weiter ab (TG P30 vs. TG P90: -32%, $p = 0,06$; TG P30 vs. TG P210: -47%, $p = 0,006$). In Wildtypmäusen war eine altersbedingte RELN-Reduktion erst im sehr hohem Alter evident (WT P30 vs. WT P210: -52%, $p < 0,001$)

und sank dann auf ein vergleichbares Niveau wie bei gleichaltrigen transgenen Mäuse (TG P210 vs. WT P210: $p = 0,505$; Abbildung 8A und B).

Mit Verlauf der Progression der AD-ähnlichen Pathologie in transgenen Mäusen war eine RELN-Defizienz im Entorhinalkortex sichtbar. Eine Reduktion des RELN-Proteinlevels konnte erst zu einem späten Zeitpunkt (P210) festgestellt werden (TG P30 vs. P210: -47% , $p = 0,009$), während in den Wildtyptieren das RELN-Level unverändert blieb (WT P30 vs. WT P210: $p > 0,999$; Abbildung 8E und F).

Im Frontalkortex blieb die RELN-Expression vom Alter oder Genotyp unbeeinflusst durch (Abbildung 8I und J).

Ähnlich wie das 180 kDa Fragment von RELN sank auch das Level von RELN 300 in Folge der AD-ähnlichen Pathologie (TG P90 vs. WT P90: -65% , $F_{5,27} = 4,55$, $p = 0,002$) und dem Alter (WT P90 vs. WT P210: -69% , $p = 0,001$) nur im Hippokampus ab (P90, Abbildung 8C).

Im Unterschied dazu blieb das RELN-Level im Entorhinal- und Frontalkortex von Alter und Krankheit unberührt (Abbildung 8G und K).

Die Quantifizierung des RELN FL zeigte ein ähnliches, wenn auch stärker ausgeprägtes Expressionsprofil verglichen mit dem des 180 kDa Fragments (Abbildung 1D, H und L). Im Hippokampus wurde ein starker Abfall des RELN-Levels bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt (P30) in den transgenen Tieren gemessen (TG P30 vs. WT P30: -71% , $p = 0,011$). Mit Zunahme des Alters, sowohl in TG als auch in WT, nahm die Reduktion des gemessenen Proteinlevels noch weiter zu (TG P30 vs. TG P90: -72% , $p = 0,033$; TG P30 vs. TG P210: -77% , $p = 0,018$). Ein altersbedingter RELN-Abfall in den gesunden Mäusen konnte erst im Alter von 210 Tagen festgestellt werden (WT P30 vs. WT P210: -89% , $p = 0,009$; Abbildung 8D).

Im Entorhinalkortex zeigte sich ebenfalls eine RELN FL-Reduktion in TG-Tieren, aber erst mit P210 (TG P30 vs. TG P210: -60% , $F_{5,49} = 2,45$, $p = 0,038$). RELN FL wies in den Wildtypen ein unverändertes Expressionslevel auf (Abbildung 8H).

Im Frontalkortex blieb wie das RELN 180 wie auch die RELN FL-Expression vom Alter und Genotyp unbeeinflusst (Abbildung 8L).

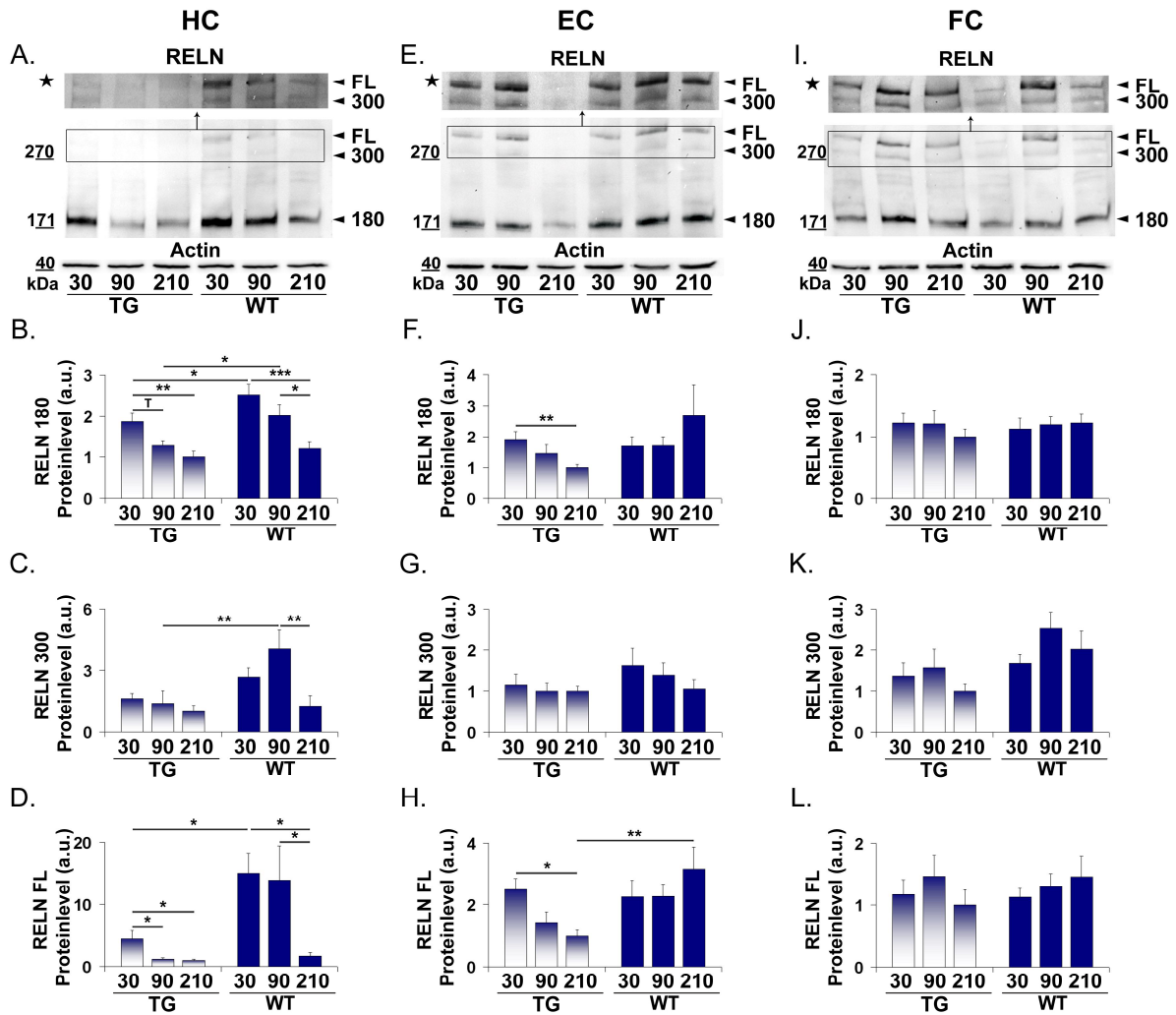


Abbildung 8: Eine Reduktion des Proteinlevels von Reelin (RELN) ist ein frühes Phänomen in den transgenen Mäusen (TG), tritt aber erst sehr spät in Wildtypmäusen (WT) auf.

Western blot-Analysen im Hippokampus (HC) weisen in TG-Mäusen eine AD- und altersbedingte RELN-Reduktion nach (A-D), die sich auch auf den Entorhinalkortex (EC) ausweitet (F und H). Im Frontalkortex (FC) bleibt das RELN-Level sowohl in TG als auch in WT unverändert (J-L). Reelin 420 (FL) und 300 sind erst nach einer längeren Expositionszeit (*) sichtbar. Die Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc* für HC und FC und Mann-Whitney U-Test für EC. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= arbitrary units.

4.1.1.2. Erhöhte RELN-Prozessierung in Mäusen mit gestörtem RELN-Level

Um festzustellen, ob der Genotyp oder das Alter einen Einfluss auf die Prozessierung haben, wurde der Quotient zwischen RELN FL und dem RELN 180 berechnet.

Die RELN-Prozessierung ist auf Grund der AD-ähnlichen Pathologie gestört (TG vs. WT: +93%, $F_{1, 28} = 9,80$, $p = 0,006$). Eine Verlagerung zugunsten des 180 kDa Fragmentes war im Hippokampus bereits in den jüngsten (P30) transgenen Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen sichtbar (TG P30 vs. WT P30: +253%, $F_{5, 24} = 4,30$, $p = 0,07$) und trat zeitgleich mit der RELN-Reduktion auf. Auch in Wildtypen war dies evident, allerdings erst mit zunehmendem Alter (WT P30 vs. WT P210: +419%, $p = 0,006$; WT P90 vs. WT P210, +258%, $p = 0,013$; Abbildung 9A). Die erhöhte Prozessierung zu Gunsten des 180 kDa Fragments scheint sich auch in einer erhöhten Immunreaktivität des extrazellulären RELN in der Hippokampusfissur niederzuschlagen (Abbildung 9A).

Im Entorhinal- und Frontalkortex kam es dagegen zu keiner veränderten Prozessierung von RELN (Abbildung 9B und C).

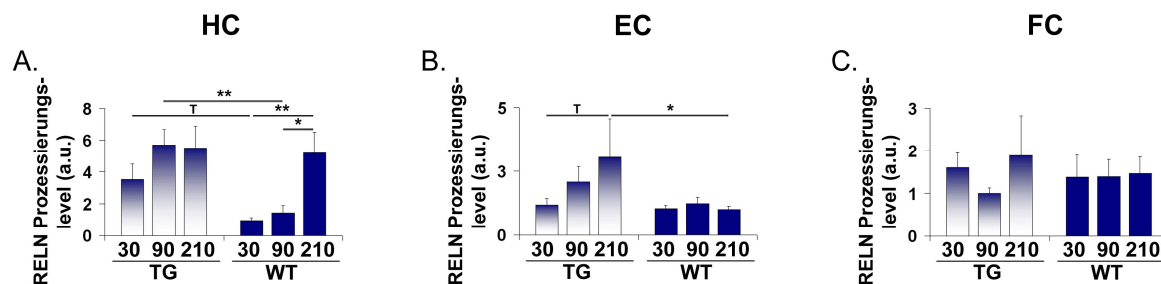


Abbildung 9: Eine erhöhte RELN-Prozessierung ist ein frühes Phänomen in den transgenen Mäusen (TG), tritt aber erst sehr spät in Wildtypmäusen (WT) auf.

Das Level der RELN-Prozessierung (ein Quotient aus den RELN Fragmenten 180 und 420 [FL]) steigt im Hippokampus (HC) in allen Altersgruppen der transgenen Mäuse, aber nur zum Zeitpunkt P210 in den Wildtypen (A). Dagegen ist ein Anstieg des Umsatzes von RELN FL zu RELN 180 im Entorhinalkortex (EC) nur in den erkrankten Tieren zum Zeitpunkt P210 zu beobachten, nicht jedoch in den gesunden Kontrollen (B). Im Frontalkortex (FC) zeigt sich keine Veränderung des errechneten Levels der Prozessierung von Reelin in Folge der AD-Pathologie oder des Alters (C). Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc* für HC und FC und Mann-Whitney U-Test für EC. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.1.3. Lokalisierung von RELN in AD-relevanten murinen Hirnarealen; eine morphometrische Analyse

Das zerebrale Expressionsmuster von RELN wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Im Hippokampus konnte insbesondere eine RELN-Absenkung im Zusammenhang mit dem Genotyp und dem Alter in der CA1 Region festgestellt werden (TG P30 vs. WT P30: -57%, $F_{3, 20} = 41,4$, $p < 0,001$; TG P30 vs. TG P210: -55%, $p = 0,014$; WT P30 vs. WT P210: -89%, $p < 0,001$). Deutlich erkennbar waren zudem eine diffuse extrazelluläre Färbung in der Hippokampusfissur sowie vereinzelte RELN-positive Interneuronen entlang des *Stratum oriens* und des *Stratum lacunosum-moleculare* (Abbildung 10A und B).

Im Entorhinalkortex der Mäuse konnte eine Abnahme von RELN in Abhängigkeit des Alters der transgenen Tiere insbesondere in den Neuronen der Schicht II festgestellt werden (TG P30 vs. TG P210: -89%, $F_{3, 20} = 27,69$, $p < 0,001$; TG P210 vs. WT P210: -86%, $p < 0,001$; WT P30 vs. WT P210: $p = 0,335$; Abbildung 10C und D).

Ähnlich der Western blot-Ergebnisse (Abbildung 8I-L), zeigt sich auch bei der Auszählung des Anteils RELN-positiver Zellen im Frontalkortex kein Unterschied in der RELN-Immunreaktivität zwischen den verschiedenen Altersstufen oder Genotypen (Abbildung 10E und F). Die extrazelluläre Färbung des frontalen und entorhinalen Neuropils war unabhängig von Alter und Genotyp (Abbildung 10C und E).

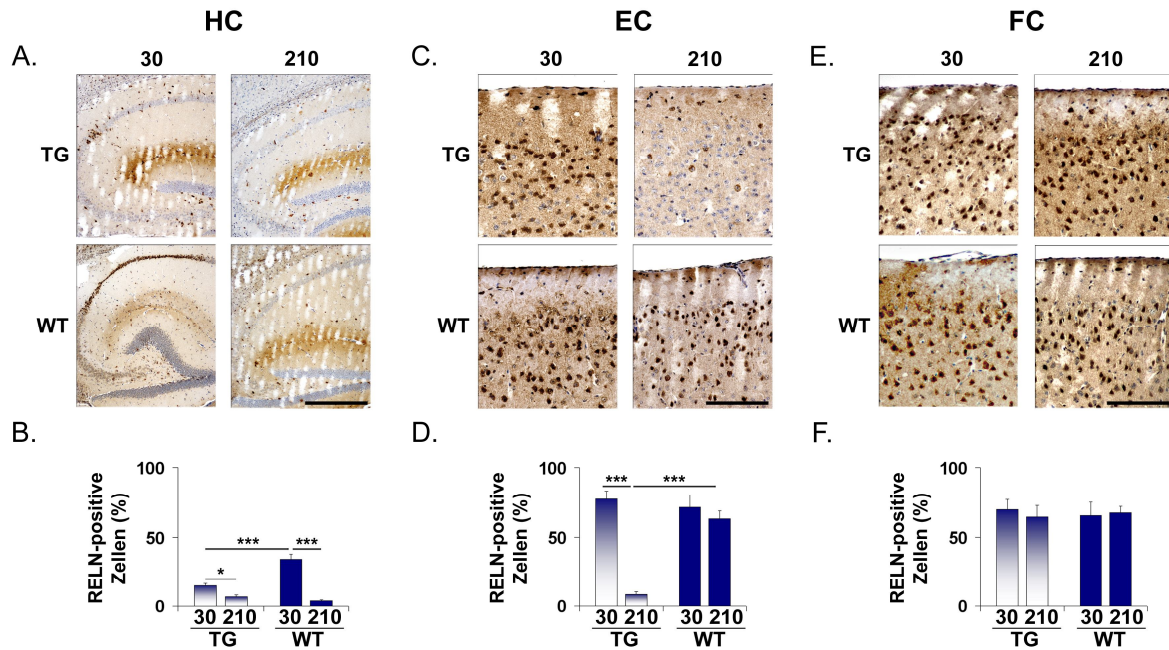


Abbildung 10: Morphometrische Auswertung der RELN-Positivität.

Eine repräsentative immunhistochemische Färbung von Reelin (RELN) zeigt im Hippokampus (HC) transgener Mäuse (TG) einen frühen Abfall (P30) in der Expression von RELN. In den Wildtypmäusen (WT) zeigt sich eine Reduktion der RELN-exprimierenden Zellen erst mit dem Alter (P210). Besonders auffällig war dies im *Cornu ammonis* 1 (A, B). Im Entorhinalkortex (EC) zeigt sich ausschließlich in TG ein Absenkung von RELN (P210), nicht aber in WT (C, D). Im Frontalkortex (FC) scheint die RELN-Expression unabhängig von der Alzheimer-Pathologie und dem Alter zu sein. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc* für HC und FC und Mann-Whitney U-Test für EC. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*; Maßstab in immunhistochemischen Bildern entspricht 500 μ m für HC und 250 μ m für EC und FC.

4.1.1.4. RELN-positive Ablagerungen im murinen Neokortex

Im Verlauf der immunhistochemischen Auswertung fielen bei den ältesten transgenen Mäusen (P210) RELN-Ablagerungen in der Schicht I des Neocortex auf (Abbildung 11A). Nach einer ThioflavinS-Gegenfärbung (Abbildung 11B) auf dem gleichen - und einer A β -Färbung (Abbildung 11D) auf einem nachfolgenden Schnitt, wurde sichtbar, dass sich die Plaque-ähnlichen RELN-Ablagerungen peripher zu den A β -Plaques befinden. Hierbei kam es aber zu keiner Ko-Lokalisation der ThioflavinS- (Abbildung 11C) und A β -Färbung (Abbildung 11E).

Die RELN-Ablagerungen traten ausschließlich in den transgenen P210 Mäusen auf, gleichaltrige oder jüngere Wildtypiere zeigten dagegen keinerlei Ablagerungen.

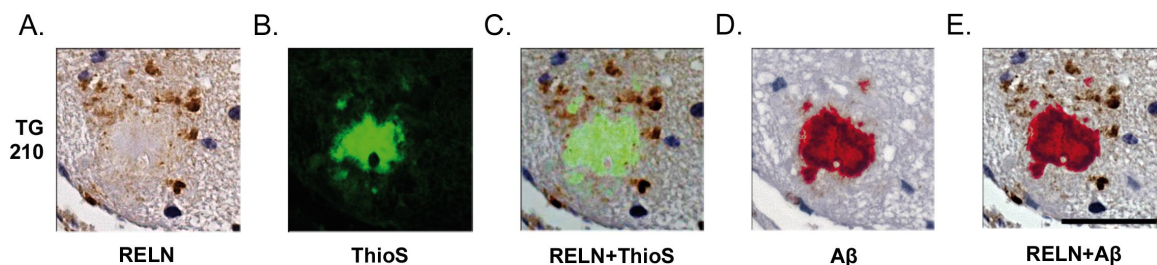


Abbildung 11: Extrazelluläre RELN-positive Ablagerungen im Neokortex von TG (P210).

Die plaqueähnlichen Ablagerungen von Reelin (RELN, A) befinden sich, nach ThioflavinS- (ThioS, B) und beta-Amyloidfärbung (A β , D), peripher zu den A β -Plaques. (C) RELN+ThioS= Überlagerung der RELN- und ThioS-Färbung; (E) RELN+A β = Überlagerung der RELN- und A β -Färbung; Maßstab in immunhistochemischen Bildern entspricht 30 μ m.

4.1.1.5. Unveränderte *Reln*-Genexpression im murinen Gehirn

Um zu ermitteln, ob die Veränderungen im *Reln*-Level auf Grund der A β -Pathologie und/oder des Alters auf der transkriptionellen oder translationellen Ebene stattfindet, wurde das mRNA-Expressionsmuster von *Reln* mittels TaqMan assay ermittelt.

Im Gegensatz zu dem ermittelten Proteinlevel von RELN in den AD-relevanten Arealen von Mäusen zeigten sich auf der Ebene der Transkription für *Reln* keine Veränderungen im Frontal-, Entorhinalkortex oder im Hippokampus (Abbildung 12A-C).

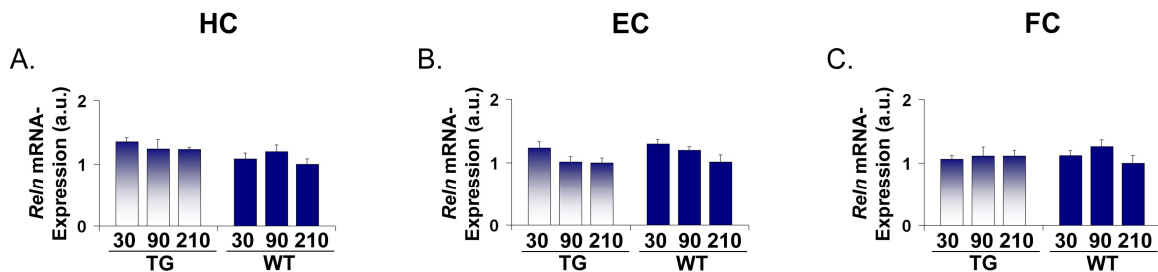


Abbildung 12: mRNA-Expression von Reelin (*Reln*).

Sowohl im Hippokampus (HC, A), im Entorhinalkortex (EC, B) und Frontalkortex (FC, C) zeigte sich keinerlei Veränderung im Expressionslevels von *Reln* auf Grund der Alzheimerpathologie oder des Alters. TaqMan-Daten wurden gegen *Gapdh* normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc* für HC und FC und Mann-Whitney U-Test für EC, a.u.= *arbitrary units*.

4.1.1.6. Expression der nachgeschalteten Proteine des murinen RELN-Signalwegs nimmt mit dem Alter ab

4.1.1.6.1. APOER2-Level im HC von alten Mäusen herunterreguliert

Die Western blot-Quantifizierung des APOER2-Proteins im Hippokampus zeigte eine altersabhängige Reduktion in beiden Genotypen ($F_{2, 33} = 22,38$, $p < 0,001$), die erst in den ältesten Tieren auftrat (TG P30 vs. TG P210: $F_{5, 30} = 4,49$, -50% , $p = 0,02$; WT P30 vs. WT P210: -82% , $p = 0,001$; Abbildung 13A).

Der entorhinale (Abbildung 13B) und frontale Kortex (Abbildung 13C) zeigte sich von der AD-ähnlichen Pathologie und dem Alter unbeeinflusst.

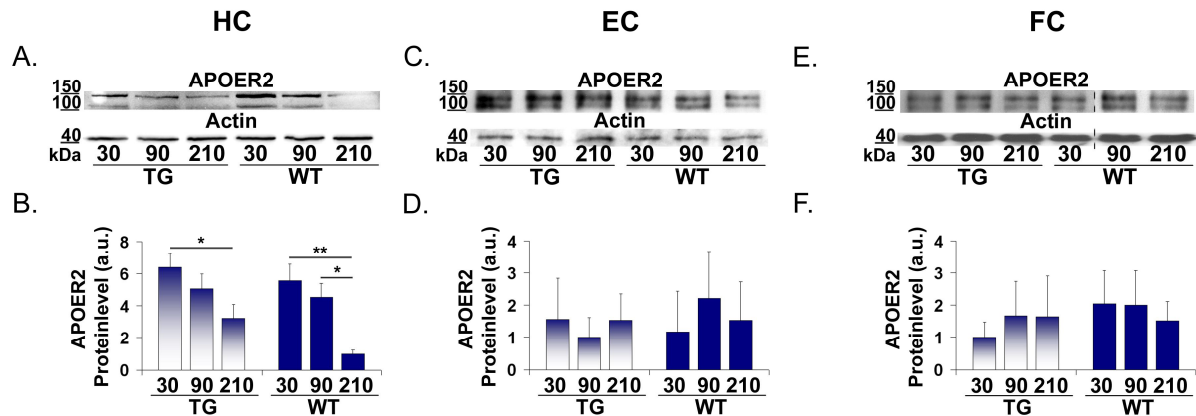


Abbildung 13: Altersbedingte APOER2-Reduktion.

Die Western blot-Analyse zeigte einen altersabhängigen Abfall von Apolipoprotein E Rezeptor 2 (APOER2) im Hippokampus (HC) der alten (210) transgenen Mäuse auf. Die Reduktion des APOER2-Levels war in den gleichaltrigen Wildtypen (WT) sogar noch stärker ausgeprägt (A-B). Im Entorhinalcortex (EC, C-D) und Frontalcortex (FC, E-F) zeigte sich keine Veränderung des APOER2-Levels in Folge der Alzheimer-Pathologie oder des Alters. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.1.6.2. Reduzierte VLDLR-Expression im HC von alten Mäusen

Im Hippokampus erwies sich das VLDLR-Level aufgrund des Genotyps als vermindert (TG vs. WT: $F_{2, 31} = 13,39$, $p < 0,001$). Diese Reduktion war erst in den ältesten Tieren detektierbar (TG P30 vs. TG P210: -44%, $F_{5, 28} = 3,07$, $p = 0,035$; WT P30 vs. WT P210: -54%, $p = 0,003$; Abbildung 14A).

Der entorhinale (Abbildung 14B) und frontale Kortex (Abbildung 14C) blieben von der AD-ähnlicher Pathologie und der Alterung unbeeinflusst.

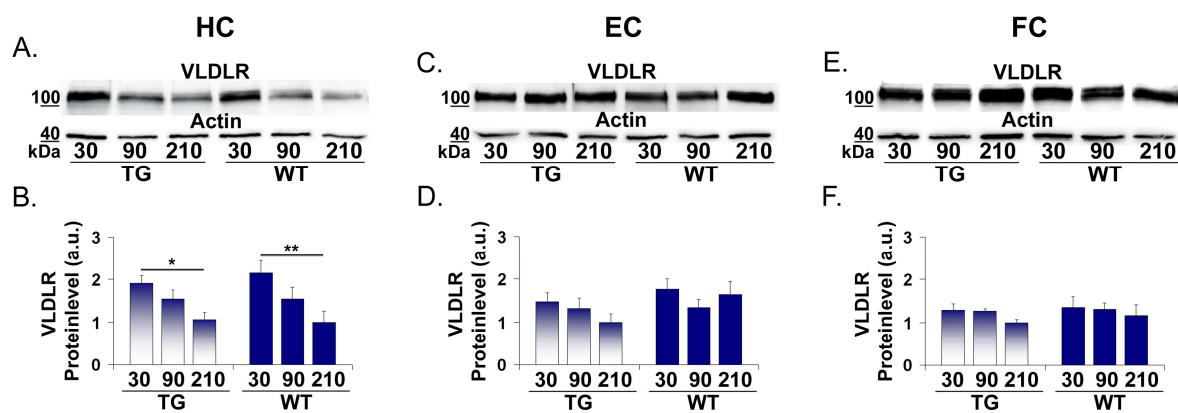


Abbildung 14: Altersbedingte VLDLR-Reduktion.

Die Western blot-Analyse zeigte einen altersabhängigen Abfall des *Very Low-Density Lipoprotein* Rezeptors (VLDLR) im Hippokampus (HC, A-B) sowohl in den transgenen Mäusen (TG) als auch in Wildtypen (WT) im spätesten untersuchten Alter (P210) auf. Im Entorhinalkortex (EC, C-D) und Frontalkortex (FC, E-F) zeigte sich keine Veränderung des VLDLR-Levels in Folge der Alzheimer-Pathologie oder des Alters. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.1.6.3. Abnahme des DAB1-Levels im HC von alten Mäusen

Für DAB1 wurde eine altersabhängige Reduktion im Hippokampus festgestellt ($F_{2,33} = 11,14$, $p = 0,001$), die zum Zeitpunkt P90 in den transgenen Mäusen (TG P30 vs. TG P90: -34%, $F_{5,30} = 3,14$, $p = 0,042$; TG P30 vs. TG P210: -40%, $p = 0,02$) und zum Zeitpunkt P210 in den Wildtypen auftrat (WT P30 vs. WT P210: -49%, $p = 0,007$; Abbildung 15A).

Im Entorhinalkortex zeigte sich nur ein altersbedingter Abfall von DAB1 in transgenen Mäusen, aber nicht im Wildtyp (TG P30 vs. TG P90: -25%, $F_{5,56} = 1,41$, $p = 0,057$; TG P30 vs. TG P210: -30%, $p = 0,027$; Abbildung 15B).

Im Frontalkortex blieb das DAB1-Level unverändert (Abbildung 15C).

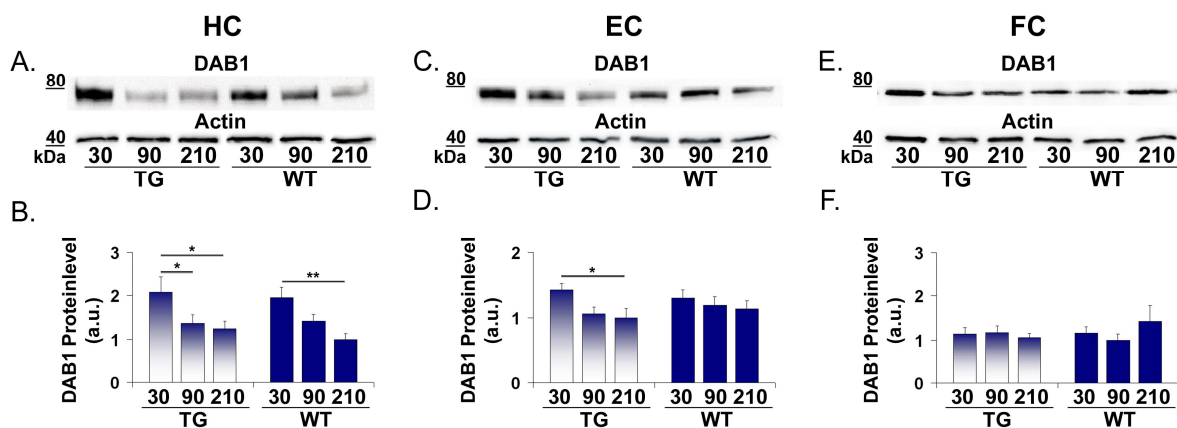


Abbildung 15: Altersbedingte DAB1-Reduktion.

Die Western blot-Analyse zeigte einen frühzeitigen Abfall von *Disabled-1* (DAB1) im Hippokampus (HC, A-B) und im Entorhinalkortex (EC, C-D) der transgenen Mäuse (TG) bereits 90 Tage nach der Geburt auf. Im HC der gesunden Kontrollen (WT) zeigte sich erst im späteren Alter (P210) eine Reduktion von DAB1. Im Frontalkortex (FC, E-F) zeigte sich keine Veränderung des DAB1-Levels in Folge der Alzheimer-Pathologie oder des Alters. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.2. RELN-Expression in AD-relevanten Hirnarealen von Menschen

4.1.2.6. RELN-Defizienz tritt in einem frühen präklinischen AD-Stadium auf

Um herauszufinden, ob die RELN-Expression auch im Menschen gestört ist, wurde mittels Western blot-Analyse das Expressionslevel von RELN in drei AD-relevanten humanen Hirnarealen (d.h. im Hippokampus, Entorhinalkortex und frontalen Neokortex) von AD-erkrankten Menschen in unterschiedlichen Krankheitsstadien (präklinisches Stadium CERAD A/Braak I-II, mittleres Stadium CERAD B/Braak III-IV, Endstadium CERAD C/Braak V-VI) sowie in einer altersadaptierten und jungen Kontrollgruppe (ohne jegliche Neuropathologie) untersucht.

In allen drei Regionen war das Level des 180 kDa Fragments von RELN in AD-Patienten herabreguliert, stets im Vergleich mit den altersadaptierten und jungen Kontrollpatienten ohne AD (HC: C/V-VI vs. KA: -56%, $F_{2,16} = 2,35$, $p = 0,038$; C/V-VI vs. KJ: -61%, $p = 0,037$; EC: C/V-VI vs. KA: -76%, $F_{2,16} = 3,59$, $p = 0,01$; C/V-VI vs. KJ: -75%, $p = 0,035$; FC: C/V-VI vs. KA: -47%, $F_{2,19} = 7,23$, $p = 0,003$; C/V-VI vs. KJ, -40%, $p = 0,035$; Abbildung 16A-B, D-E, G-H). Das Alter selbst beeinflusst das Expressionsprofil von RELN nicht (HC: KA vs. KJ: $p = 0,342$; EC: KA vs. KJ: $p = 0,424$; FC: KA vs. KJ: $p = 0,489$).

Das ~300 kDa Fragment von RELN konnte auf Grund der häufig nicht sichtbaren Banden in den Western blots nicht gemessen werden.

Für FL RELN konnte wie für das RELN 180 in allen drei untersuchten Hirnarealen eine Reduktion des Proteinlevels in Folge der AD festgestellt werden (HC: C/V-VI vs. KA: -71%, $p = 0,025$; C/V-VI vs. KJ: -70%, $p = 0,025$; EC: C/V-VI vs. KA: -65%, $p = 0,084$; C/V-VI vs. KJ: -71%, $p = 0,095$; FC: C/V-VI vs. KA: -36%, $p = 0,059$; C/V-VI vs. KJ: -52%, $p = 0,044$; Abbildung 16C, E, I). Die Alterung selbst beeinflusste die RELN FL-Expression nicht (HC: KA vs. KJ: $p = 0,444$; EC: KA vs. KJ: $p = 0,286$; FC: KA vs. KJ: $p = 0,135$).

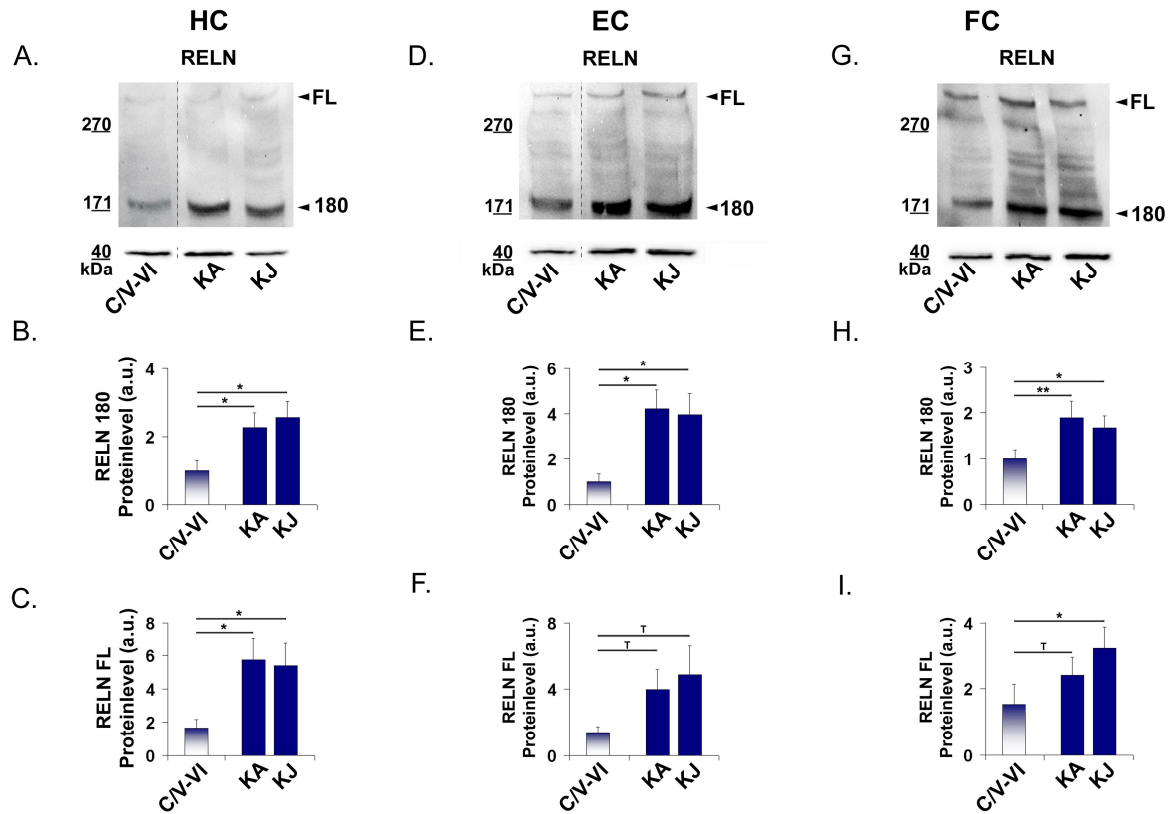


Abbildung 16: Reelindefizienz zeigte sich in AD-Patienten, aber nicht in gesunden älteren Menschen. Die Western blot-Analyse zeigte sowohl für die Fragmente 180 und 420 (FL) von Reelin (RELN) im Hippokampus (HC, A-C), im Entorhinalkortex (EC, D-F) und im Frontalkortex (FC, G-I) eine Reduktion des Proteinlevels in AD-Patienten im CERAD C/Braak & Braak V-VI (C/V-VI)-Stadium. Dagegen blieb das RELN-Level in den jungen (KJ) sowie gleich alten (KA) Kontrollen ohne AD unverändert. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. Gestrichelte Linien zeigen zusammengeschnittene Western blot-Bilder (A, D) an. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.3.1. Unveränderte RELN-Prozessierung in allen humanen AD-relevanten Hirnarealen

Wie für die Mausuntersuchungen wurde auch für den Menschen ein Quotient aus dem ungeschnittenen RELN (FL) und dem 180 kDa Fragment errechnet. Die Untersuchung ergab, dass weder die AD-Pathologie noch das Alter einen Einfluss auf die Prozessierung im Frontal-, Entorhinalkortex und Hippokampus haben (HC: C/V-VI vs. KA: $F_{2, 15} = 0,28$, $p = 0,505$; C/V-VI vs. KJ: $p = 0,876$; KA vs. KJ: $p = 0,63$ [Abbildung 17A]; EC: C/V-VI vs. KA: $F_{2, 12} = 0,05$, $p = 0,94$; C/V-VI vs. KJ: $p = 0,832$; KA vs. KJ: $p = 0,76$ [Abbildung 17B]; FC: C/V-VI vs. KA: $F_{2, 14} = 0,75$, $p = 0,665$; C/V-VI vs. KJ: $p = 0,482$; KA vs. KJ: $p = 0,242$ [Abbildung 17C]).

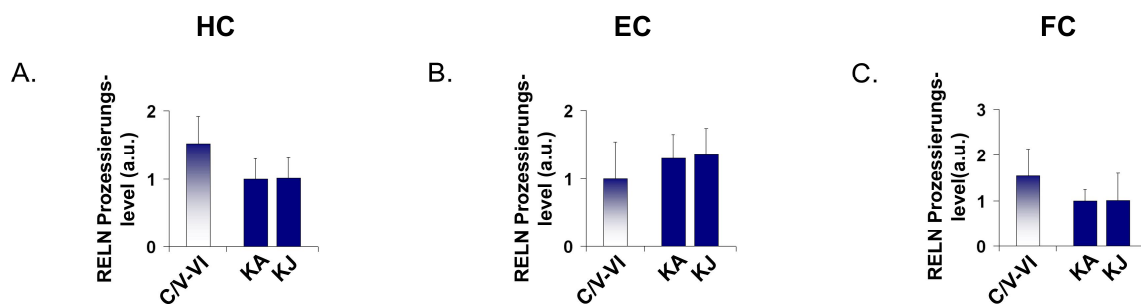


Abbildung 17: Unveränderte Prozessierung von Reelin.

Das Level der RELN-Prozessierung (ein Faktor errechnet aus den RELN Fragmenten 180 und 420 [FL]) war im Hippokampus (HC, A), im Entorhinalkortex (EC, B) und im Frontalkortex (FC, C) sowohl in den alzheimerkranken Patienten im CERAD C/Braak & Braak V-VI (C/V-VI)-Stadium, sowie in den jungen (KJ) und gleichaltrigen (KA) Kontrollen unverändert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.3.2. RELN-Reduktion im präklinischen Stadium von AD; eine morphometrische Analyse

Die morphologische Untersuchung stützt die gewonnenen Western blot-Daten.

Im Frontalkortex zeigte sich ein Abnahme der RELN-positiven Zellen, insbesondere in Schicht II, bereits zu Beginn der AD im CERAD A/Braak & Braak I-II-Stadium (A/I-II vs. KA: -46%, $F_{4, 66} = 4,93$, $p = 0,042$; A/I-II vs. KJ: -54%, $p = 0,005$). Alterung selbst beeinflusste das Expressionsprofil von RELN nicht (KA vs. KJ: $p = 0,592$; Abbildung 18E-F).

Im Entorhinalkortex war nur eine Reduktion der RELN-positiven Pyramidenzellen, insbesondere der Schicht II, im CERAD C/Braak & Braak V-VI-Stadium im Vergleich zu den früheren AD-Stadien (A/I-II vs. C/V-VI: -62%, $p = 0,035$; B/III-IV vs. C/V-VI: -61%, $p = 0,04$) oder zu alten und jungen Kontrollpatienten messbar (C/V-VI vs. KA: -69%, $p = 0,078$; C/V-VI vs. KJ: -81%, $p = 0,016$). Die diffuse Färbung im Neuropil verringerte sich analog zu der Reduktion von RELN-positiven Neuronen. Das Alter selbst beeinflusste die RELN-Expression im Entorhinalkortex nicht (KA vs. KJ: $p = 0,582$; Abbildung 18C-D).

Im Hippokampus zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen AD-Stadien oder Kontrollgruppen. Dies scheint sich durch die geringe Anzahl von RELN-positiven Neuronen in allen untersuchten Gruppen zu erklären (A-B). Auffällig war eine starke Färbung der Neuriten in den Regionen CA2 bis CA4 in den altersadaptierten und jungen Kontrollpatienten und auch den frühen AD-Stadien. Erst mit CERAD C/V-VI kam es zu einem dramatischen Verlust der RELN-Positivität der Neuriten, was die Messergebnisse für den Hippokampus aus der Western blot-Analyse erklären könnte (Abbildung 18A, vergrößerter Bildausschnitt).

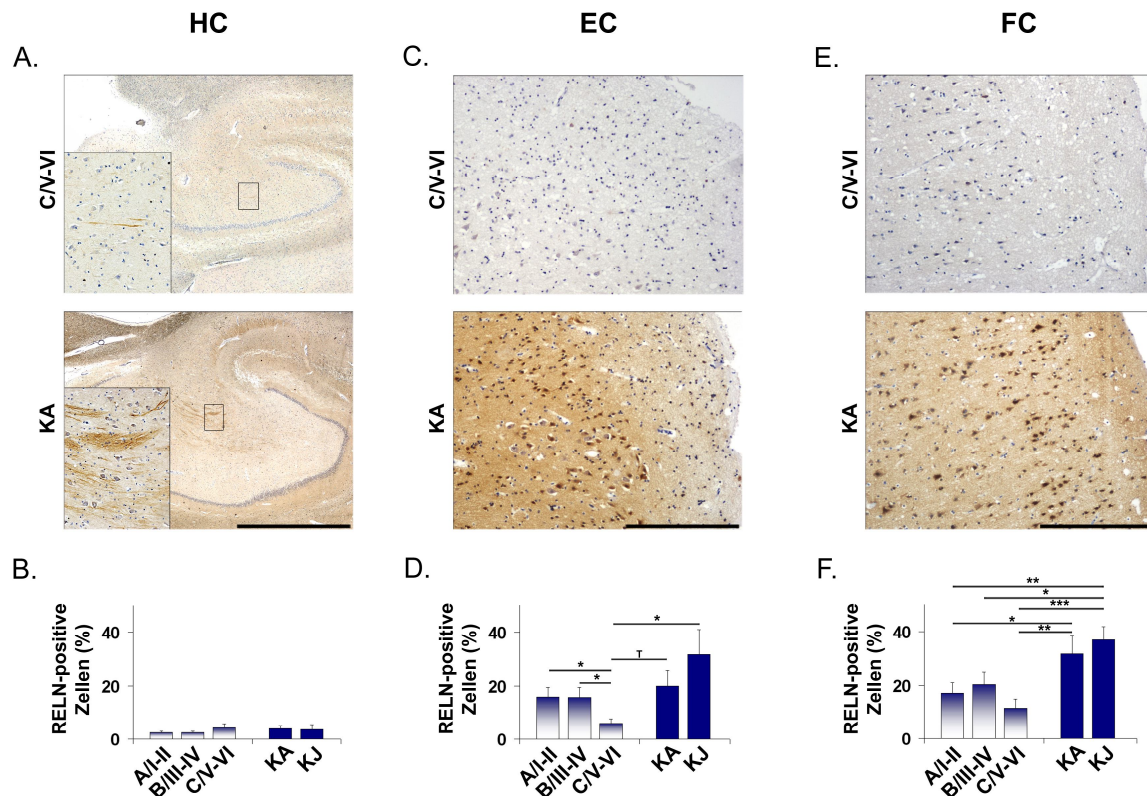


Abbildung 18: RELN-Defizienz trat bereits im frühesten Krankheitsstadium der AD auf, nicht jedoch in gleichaltrigen gesunden Menschen.

Im Frontalkortex (FC, E-F) zeigte sich speziell in der Schicht II des Neokortex ein Abfall des neuronalen RELN bereits im CERAD A/Braak & Braak I-II (A/I-II)-Stadium. Dagegen zeigte sich kein RELN-Verlust in den gesunden Kontrollen (KJ, KA). Im Entorhinalkortex EC (C-D) war, im Vergleich zu KJ, eine Reduktion des neuronalen RELN in den AD-Patienten im CERAD C/ Braak & Braak V-VI (C/V-VI)-Stadium messbar. Sowohl in FC als auch in EC zeigte sich ein Rückgang der diffusen RELN-positiven Färbung des Neuropils im Zusammenhang mit AD (C, E). In Folge der geringen Anzahl RELN-positiver Neuronen im Hippokampus (HC) konnte kein Unterschied in der Expression von RELN in den unterschiedlichen Gruppen gemessen werden (A-B). Es fiel jedoch auf, dass das RELN-positiv gefärbte Neuropil und die Neuriten in den HC-Arealen *Cornu ammonis* 2, 3 und 4 in KJ und KA, im Verlauf der AD (C/V-VI) schwächer wurden (A, vergrößerter Bildausschnitt). Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc* für HC und FC und Mann-Whitney U-Test für EC. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*; Maßstab in immunhistochemischen Bildern entspricht 500 µm für HC und 100 µm für EC und FC.

4.1.3.3. RELN-positive Ablagerungen FC und HC von AD-Patienten

Wie bei der Maus fanden sich auch im menschlichen Gehirn die schon beschriebenen RELN-Ablagerungen (Abbildung 19A). Die Ablagerungen beschränkten sich allein auf AD-erkrankte Patienten. Im Frontalkortex waren die plaqueähnlichen RELN-Ablagerungen in Schicht I-II nachweisbar und nahmen in der Anzahl pro Fläche (n/cm^2) im Verlauf der AD zu (A/I-II: $0,43 \pm 0,17$; B/III-IV: $1,23 \pm 0,41$; C/V-VI: $1,58 \pm 0,29$; A/I-II vs. B/III-IV: $+188\%$, $F_{2, 20} = 2,12$, $p = 0,087$; A/I-II vs. C/V-VI: $+270\%$, $p = 0,029$; B/III-IV vs. C/V-VI: $p = 0,267$). Die Verteilung der Reelinablagerungen im HC in AD-Patienten im Stadium CERAD C/Braak & Braak V-VI war nur auf das *stratum lacunosum-moleculare* beschränkt. Der Entorhinalkortex zeigte keinerlei Ablagerungen von RELN. ThioflavinS-Gegenfärbungen (Abbildung 19B) und beta-Amyloid immunhistochemische Färbungen (Abbildung 19D) zeigten, dass die RELN-Ablagerungen die beta-Amyloid-Plaques umgeben, aber nicht ko-lokalisiert sind (Abbildung 19C, E).

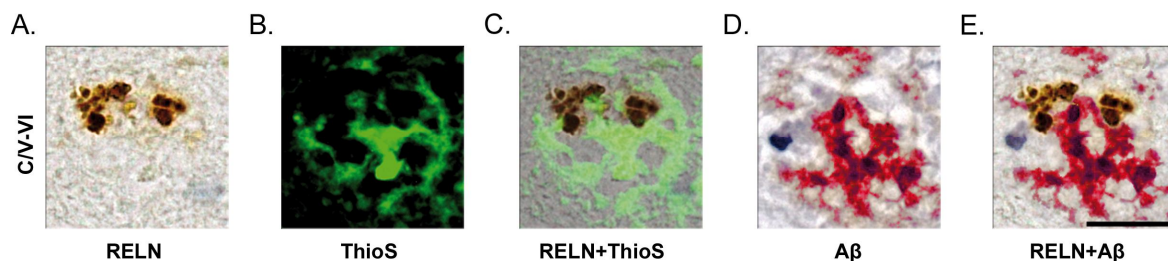


Abbildung 19: Extrazelluläre RELN-positive Ablagerungen im Neokortex von AD-Patienten (CERAD C/Braak & Braak V-VI Stadium, C/V-VI).

Die plaqueähnlichen Ablagerungen von Reelin (RELN, A) befanden sich, nach ThioflavinS- (ThioS, B) und beta-Amyloid ($A\beta$, D)-Färbung peripher zu den beta-Amyloidplaques. (C) RELN+ThioS= Überlagerung der RELN- und ThioS-Färbung; (E) RELN+ $A\beta$ = Überlagerung der RELN- und $A\beta$ -Färbung; Maßstab in immunhistochemischen Bildern entspricht $15 \mu m$.

4.1.3.4. Herunterregulierung von *RELN* auf transkriptioneller Ebene im humanen Gehirn

Es wurde zusätzlich das Expressionslevel des *RELN*-Gens im Hippokampus, Entorhinal- und Frontalkortex in AD-Patienten und Kontrollen gemessen.

In Übereinstimmung mit den Western blot-Daten für das humane *RELN*, konnte auch auf der transkriptionellen Ebene eine Herabregulierung von *RELN* in allen untersuchten Hirnarealen konstatiert werden (HC: C/V-VI vs. KA: -59%, $F_{2,13} = 2,49$, $p = 0,09$; C/V-VI vs. KJ: -69%, $p = 0,072$ [Abbildung 20A]; EC: C/V-VI vs. KA: $F_{2,14} = 11,79$, $p = 0,001$; C/V-VI vs. KJ: $p = 0,002$ [Abbildung 20B]; FC: C/V-VI vs. KA: $F_{2,15} = 2,46$, $p = 0,133$; C/V-VI vs. KJ: -80%, $p = 0,054$ [Abbildung 20C]). Die Genexpression von *RELN* war in den Kontroll-Patienten vom Alter unbeeinflusst (HC: KA vs. KJ: $p = 0,615$; EC: KA vs. KJ: $p = 0,995$; FC: KA vs. KJ: $p = 0,583$).

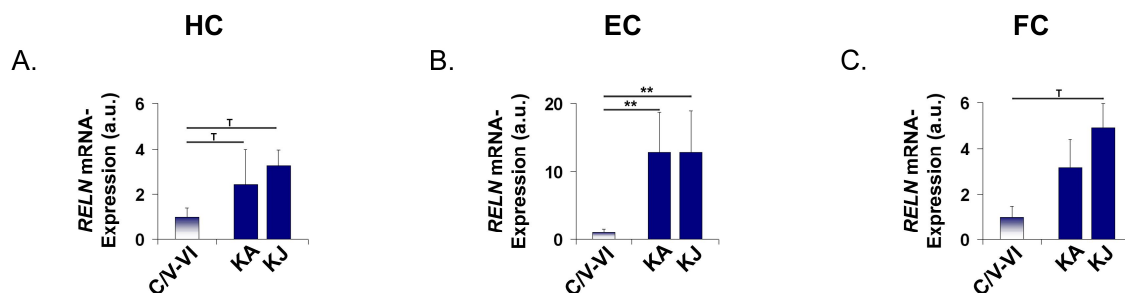


Abbildung 20: mRNA-Expression von Reelin (*RELN*).

Sowohl im Hippokampus (HC, A), im Entorhinalkortex (EC, B) und Frontalkortex (FC, C) zeigte sich eine Reduktion im Expressionslevel von *RELN* auf Grund der AD-Pathologie (CERAD C/Braak & Braak V-VI [C/V-VI]-Stadium), nicht aber jungen (KJ) und gleichaltrigen (KA) Kontrollen. TaqMan-Daten wurden gegen GAPDH normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. a.u. = arbitrary units.

4.1.3.5. Die nachgeschalteten Proteine des humanen RELN-Signalwegs in AD und Alter

4.1.3.5.1. Unveränderte APOER2-Expression im Menschen

Die Expression in den untersuchten Hirnarealen war weder durch die beta-Amyloidpathologie noch durch das Alter beeinflusst (Abbildung 21A-F).

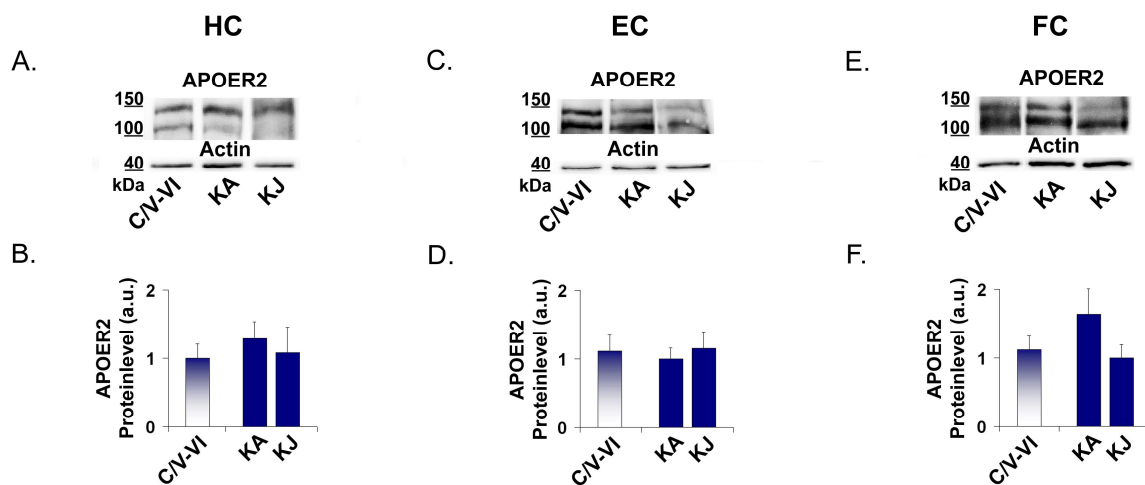


Abbildung 21: Unveränderte APOER2-Reduktion.

Die Western blot-Analyse zeigte im Hippokampus (HC, A-B), im Entorhinalkortex (EC, C-D) und im Frontalkortex (FC, E-F) keine Veränderung des Apolipoprotein E Rezeptor 2 (APOER2) -Levels in Folge der Alzheimer-Pathologie (CERAD C/Braak & Braak V-VI [C/V-VI]-Stadium) oder des Alters. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.3.5.2. Reduzierung der VLDLR-Expression in Folge der AD im Menschen

VLDLR zeigte im Hippokampus (C/V-VI vs. KA: -48%, $F_{2, 16} = 1,98$, $p = 0,032$; Abbildung 22A-B), im Entorhinalkortex (C/V-VI vs. KA: -51%, $F_{2, 16} = 4,25$, $p = 0,005$; Abbildung 22C-D) sowie im Frontalkortex (C/V-VI vs. KA: -48%, $F_{2, 19} = 3,70$, $p = 0,011$; Abbildung 22E-F) eine Herabregulierung auf Grund der AD.

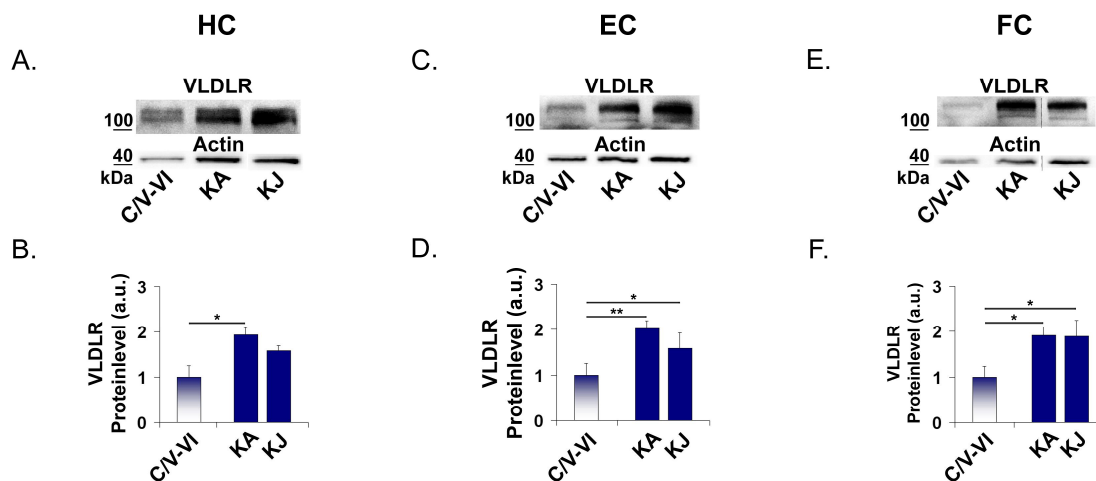


Abbildung 22: AD-bedingte VLDLR-Reduktion.

Die Western blot-Analyse zeigte einen Abfall des *Very Low-Density Lipoprotein* Rezeptors (VLDLR) im Hippokampus (HC, A-B), im Entorhinalkortex (EC, C-D) und im Frontalkortex (FC, E-F) in Folge der AD-Pathologie (CERAD C/Braak & Braak V-VI [C/V-VI]-Stadium). Alter (junge [KJ] und gleichaltrigen [KA] Kontrollen) veränderte sich das VLDLR-Level dagegen nicht. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. Gestrichelte Linien zeigen zusammengeschnittene Western blot-Bilder (E) an. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.1.3.5.3. Überexpression von DAB1 im HC und EC von AD-Patienten

Im Hippokampus war eine Hochregulierung von DAB1 festzustellen (C/V-VI vs. KA: +76%, $F_{2, 16} = 2,09$, $p = 0,034$; Abbildung 23A-B), ebenso verhielt es sich im Entorhinalkortex (C/V-VI vs. KJ: +32%, $F_{2, 16} = 2,71$, $p = 0,017$; Abbildung 23C-D). Das Alter der Patienten spielte in diesem Falle keine Rolle. Einzig im frontalen Kortex war weder durch die AD noch durch die Alterung eine Veränderung im DAB1-Level zu beobachten (Abbildung 23E-F).

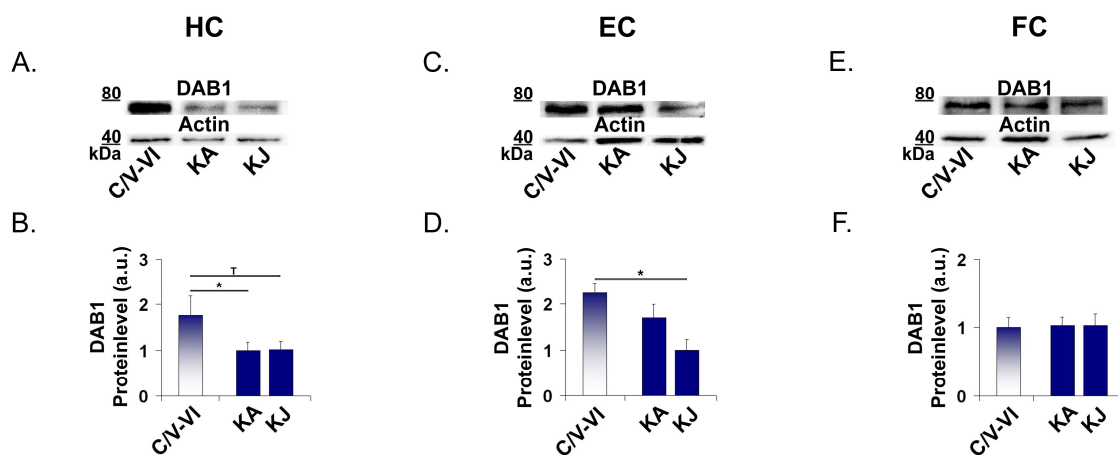


Abbildung 23: Alzheimerbedingte DAB1-Überexpression.

Die Western blot-Analyse zeigt eine Überexpression von *Disabled-1* (DAB1) im Hippokampus (HC, A-B) und im Entorhinalkortex (EC, C-D) der Alzheimerpatienten im CERAD C/Braak & Braak V-VI (C/V-VI)-Stadium. Die jungen (KJ) und alten (KA) gesunden Kontrollen zeigten keine Abweichungen im Proteinlevel für DAB1. Im Frontalkortex (FC, E-F) zeigte sich keine Veränderung des DAB1-Niveaus in Folge der Alzheimer-Pathologie oder des Alters. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.2. Regulation des RELN-Signalweges in Abhängigkeit von pränatalem und postnatalem *Enrichment*

Vorstudien konnten zeigen, dass physische Aktivität einen positiven Einfluss auf die AD-Pathologie hat und die transgenen Mäuse bei entsprechender Haltung auch kognitiv besser abschneiden als ihre weniger aktiven transgenen Wurfgeschwister. Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob der RELN-Signalweg, der essentiell für die neuronale Entwicklung des Gehirns und im adulten Gehirn für die Lernprozesse ist, durch den Einfluss pränatalen und postnatalen *Enrichments* von transgenen Mäusen eine veränderte Regulation im Vergleich zu den transgenen Kontrollen aufzeigt.

4.2.3. RELN-Expression in pränatal stimulierten Mäusen hochreguliert

4.2.3.1. Western blot-Analyse zeigte eine Erhöhung des RELN-Levels in pränatal stimulierten Mäusen

Die Quantifizierung des 180 kDa Fragments von RELN durch Western blot erwies, dass die unter Standardbedingungen gehaltenen transgenen Mäuse im Vergleich zu gesunden Wildtypen (aus *standard* Haltung, SH) eine Reduktion des Proteinlevels aufwiesen (TG vs. WT, -34%, $F_{1,39} = 16,64$, $p < 0,001$). Dies bestätigt die vorangegangene Voruntersuchung.

Pränatale Stimulation in Form von maternalem Laufen, nicht aber postnatale Laufrad laufen, führt zu einer Überexpression von RELN 180 in den transgenen Mäuse ($F_{2,38} = 4,74$, $p = 0,014$), sogar auf WT-Maus mSH Niveau (TG mLR vs. TG mSH, +50%, $p = 0,066$; TG mLR vs. WT mSH, $p = 0,743$) und erhöhte sogar die RELN-Expression in den Wildtypen (WT mSH vs. WT mLR, +36%, $p = 0,022$; Abbildung 24A-B).

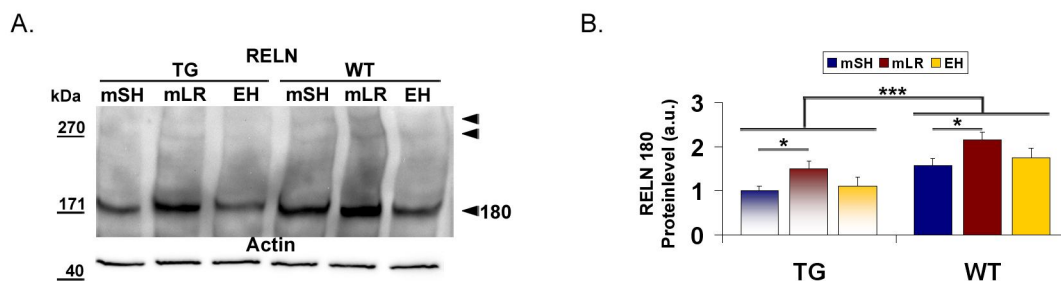


Abbildung 24: Maternale Aktivität förderte die RELN-Expression.

Die transgenen (TG) Nachkommen zeigten im Vergleich zu den Wildtypmäusen (WT) eine Reelin- (RELN 180) Reduktion auf. In Folge pränataler Stimulation (durch maternales Laufen, mLR) kam es zu einer RELN-Überexpression sowohl in TG als auch WT im Vergleich zu nicht stimulierten Müttern (mSH). Postnatale Aktivität (EH) beeinflusste das RELN-Level dagegen nicht. Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

4.2.3.2. Lokalisation von RELN im HC von prä- und postnatal stimulierten Mäusen

Die repräsentativen RELN-Färbungen für die untersuchten Gruppen zeigten im des *Stratum oriens* und *Stratum lacunosum-moleculare* sowie in der pyramidalen Zellschicht, insbesondere im Bereich von CA2 und CA3, eine erhöhte RELN-Reaktivität. Zusätzlich war in solchen Nachkommen, deren Mütter im Laufrad gelaufen sind, die Hintergrundfärbung im gesamten Hippokampus stärker, was auf eine verstärkte RELN-Sekretion zurück geführt werden könnte (Abbildung 25).

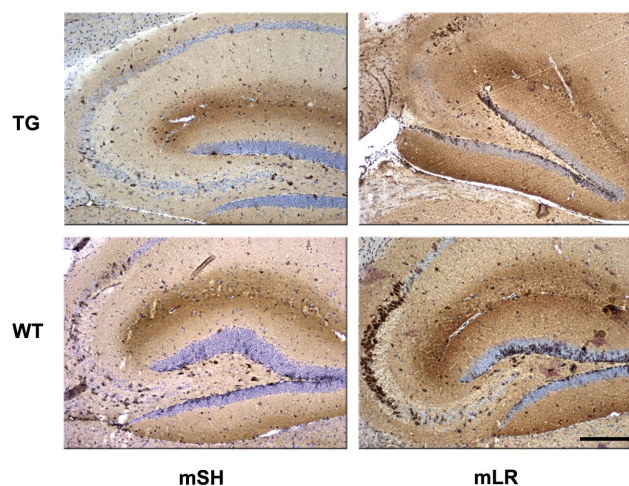


Abbildung 25: Maternale Aktivität förderte die RELN-Expression (Immunhistochemie).

Morphometrische Untersuchungen zeigten eine erhöhte Reelin (RELN)-Reaktivität im vereinzelten Zellen des *Stratum oriens* und des *Stratum lacunosum-moleculare* sowie den Pyramidenzellen im *Cornu ammonis* 2 und 3 im Vergleich zu Müttern, die keine zusätzliche physische Aktivität während der Trächtigkeit hatten (mSH). Zusätzlich war in den mLR Mäusen (sowohl transgenen [TG] als auch Wildtypmäusen [WT]) eine verstärkte Färbung des Neuropils zu erkennen. Maßstab entspricht 200 µm.

4.2.3.3. Unverändertes Methylierungsmuster des *Reln*-Promoters in pränatal stimulierten Mäusen

Die Bisulfitsequenzierung des *Reln*-Promoters von TG- und WT-Mäusen aus einem pränatalen *Enrichment* sollte aufzeigen, ob es sich bei der veränderten RELN-Expression von pränatal stimulierten Mäusen um einen epigenetischen Effekt handelt.

Es wurden keine Unterschiede im der Methylierungsmuster des *Reln*-Promoters gemessen. Die mitgeführte Methylierungskontrolle dagegen war positiv. Es ist anzunehmen, dass die Sensitivität der Sequenzierung nicht hoch genug war, um die geringfügige Veränderungen im Methylierungsstatus des Promoters festzustellen.

4.2.4. Unveränderte Expression der nachgeschalteten Proteine der RELN-Signalkaskade in prä- und postnatal stimulierten Mäusen

Die Western blot-Quantifizierung der restlichen Mitglieder RELN-Signalkaskade zeigte jeweils eine erhöhte Expression für APOER2, VLDLR und DAB1 in transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypen (APOER2: +892%, $F_{1, 28} = 32,58$, $p < 0,001$; VLDLR: +34%, $F_{1, 40} = 7,81$, $p = 0,008$; DAB1: +97%, $F_{1, 42} = 36,54$, $p < 0,001$).

Weder maternale noch postnatale Aktivität hatte Einfluss auf das Level der einzelnen Proteine (APOER2: $F_{2, 27} = 0,67$, $p = 0,522$; VLDLR: $F_{2, 39} = 3,2$, $p = 0,051$; DAB1: $F_{2, 41} = 1,15$, $p = 0,328$; Abbildung 26A-B).

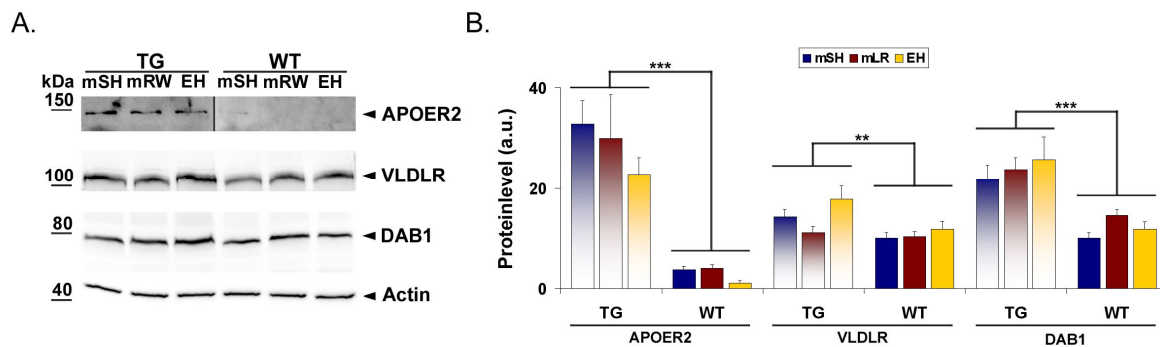


Abbildung 26: Weder maternale noch postnatale Aktivität förderte die Expression der nachgeschalteten Mitglieder der RELN-Signalkaskade.

Sowohl für den Apolipoprotein E Rezeptor 2 (APOER2), *Very Low Density Lipoprotein* Rezeptor (VLDLR) und *Disabled-1* (DAB1) konnte in den transgenen (TG) Mäusen eine erhöhte Expression gemessen werden. Weder maternale (mLR) noch postnatale (EH) Aktivität beeinflusste die Expression dieser Proteine im Vergleich zu der Kontrolle (mSH). Western blot-Daten wurden gegen Aktin normalisiert. Dargestellte Werte sind angegeben in Mittelwert \pm SEM. Statistik mittels ANOVA mit LSD als *post hoc*. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; a.u.= *arbitrary units*.

5. Diskussion

5.1. RELN-Signalskaskade in der AD-Pathologie von Mensch und Maus

Es bleibt weiterhin eine wichtige Aufgabe der Forschung den Mechanismus der Entstehung der AD zu verstehen. Da das Lernen und die Gedächtnisbildung bei AD-Erkrankten gestört sind, liegt es nahe, dass Reelin samt seinen Bindungspartnern wichtig für die Plastizität im adulten Gehirn ist und einen Einfluss auf die AD-Pathologie ausübt. Erste *in vitro* Studien zeigen, dass offenbar ein Zusammenhang zwischen Reelin und AD besteht (Beffert et al., 2002; D'Arcangelo et al., 1999; He et al., 2007; Hiesberger et al., 1999; Hoe and Rebeck, 2008; Hoe et al., 2006; Ohkubo et al., 2003). *In vivo* Studien an AD-Patienten oder im transgenen Mausmodell sind dagegen rar und teils widersprüchlich (Botella-Lopez et al., 2006; Botella-Lopez et al., 2010; Chin et al., 2007; Saez-Valero et al., 2003). Es fehlen systematische Untersuchungen aller AD-relevanten Hirnareale zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs der AD sowohl im Menschen als auch in der Maus.

5.1.1. Reduktion von RELN ist ein frühes Phänomen in der AD-Pathologie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die AD-Pathologie bei Mäusen und Menschen, als auch das Alter von Mäusen mit einer RELN-Reduktion assoziiert ist.

Eine RELN-Reduktion in AD-erkrankten Individuen ist zudem ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der AD-ähnlichen Erkrankung. Die RELN-Defizienz beginnt bereits vor dem Auftreten erster Amyloid-Plaques im murinen HC (P30) und im präklinischen AD-Stadium (CERAD A/Baars & Braak I-II) im humanen FC. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die RELN-Defizienz mit zunehmendem Verlauf der Erkrankung immer weiter im gesamten Gehirn ausbreitet.

In den Mäusen zeigte sich mit P30 im HC eine RELN-Reduktion, die erst mit zunehmendem Alter (P90-210) im EC zu messen war, was eine vorangegangene Studie von Chin et al (2007) bestätigt. Allerdings wurde in der Untersuchung von Chin et al. ausschließlich eine ausgeprägte AD-ähnliche Pathologie berücksichtigt, nicht jedoch frühere Stadien der Krankheit.

Im Menschen begann die RELN-Defizienz im FC im präklinischen Stadium CERAD A/Braak & Braak I-II und weitete sich mit dem Erreichen des AD-Stadiums CERAD C/Braak & Braak V-VI auch auf den HC und EC aus. In den gesunden Individuen

dagegen konnte ausschließlich im HC alter Mäuse (P210) ein RELN-Abfall gemessen werden, nicht jedoch in den untersuchten Hirnarealen des Menschen.

Die morphometrische Untersuchung bestätigte, dass es sich bei dem Abfall des RELN-Levels im murinen und humanen Gehirn tatsächlich um einen Verlust der RELN-Expression in den Nervenzellen handelt und nicht auf eine reduzierte Neuronenzahl zurückzuführen ist (Chin et al., 2007). Einzig im humanen HC erbrachte die morphometrische Auszählung keine Veränderung im Expressionsverhalten der RELN-exprimierenden Nervenzellen. Dafür ließ sich ein drastischer Abfall des extrazellulär vorliegenden RELN der HC-Fissur und des RELN innerhalb der hippocampalen Neuriten erkennen (Abbildung 18A Inlayer). Die Neuriten sind mögliche Projektionen aus dem EC und münden dort über den *Traktus perforans* in dem *Gyrus dentatus* und dem *Stratum lacunosum* des HC (Martinez-Cerdeno et al., 2002; van Groen et al., 2003; Ramos-Moreno et al., 2006). Es ist daher plausibel, dass die im Western blot gemessene RELN-Störung für den menschlichen Hippokampus in einer Störung des Transportes von RELN über den *Traktus perforans* begründet ist. Dies ist bedingt durch eine Reduktion der RELN-Expression im EC.

Die mRNA-Quantifizierung in der Maus zeigte, dass das Expressionslevel von *Reln* weder durch Alter noch durch den Genotyp beeinflusst wird. Daraus lässt sich ableiten, dass es im erkrankten Organismus, bzw. in den alten gesunden Mäusen, post-transkriptionell zu einer Regulierung von *Reln* kommt.

Im Menschen dagegen ergaben die Messungen des *RELN*-Gens eine AD-spezifische Reduktion bereits auf Ebene der Transkription. Dieses Ergebnis für FC widerspricht, zusammen mit der Reduktion des RELN-Proteins, in AD-Patienten einer vorangegangenen Studie von Botella-Lopez et al. (2006, 2010). Danach findet eine Erhöhung des RELN-Protein- und mRNA-Levels in AD-betroffenen FC statt. Diese divergierenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch methodische Unterschiede erklären. Die hier vorliegende Studie untersuchte die RELN-Expression im vorderen *Gyrus frontalis medius* (nach Mirra et al., 1991 und Mirra et al., 1993), Botella-Lopez im *Pars opercularis* des *Gyrus frontalis inferior*.

Das ungeschnittene RELN (FL) wird unter anderem in zwei Fragmente, die ~300 kDa und 180 kDa groß sind, geschnitten (Jossin et al., 2004; Lambert de Rouvroit et al., 1999).

Die hiesige Studie konnte im murinen Gehirn nicht nur ein vermindertes RELN-Level, sondern auch eine erhöhte RELN-Prozessierung feststellen. Dies war im HC und EC sowohl bei erkrankten Mäusen, als auch im HC bei fortgeschrittenem Alter (P210) gesunder Mäuse der Fall. Dieses Ergebnis lässt möglicherweise auf einen kompensatorischen Mechanismus für den RELN-Abfall in den untersuchten Hirnarealen schließen.

Analyse humaner Proben konnten keine Veränderung der Prozessierung von RELN nachweisen. Es ist wahrscheinlich, dass in dem hier untersuchten späten AD-Stadium (CERAD C/Braak & Braak V-VI) der oben beschriebene kompensatorische Mechanismus nicht mehr effektiv genug ist. Somit erscheint es aussichtsreich die Untersuchung der RELN-Prozessierung in früheren Stadien der AD-Krankheit (CERAD A/Braak & Braak I-II und CERAD B/Braak & Braak III-IV) bei nachfolgenden Studien zu thematisieren.

5.1.2. Reelin aggregiert in AD-betroffenen Gehirnen

In den RELN gefärbten Hirnschnitten von Mensch und Maus wurden RELN-positive Ablagerungen gefunden, ebenso wie in vorherigen Untersuchungen (Doehner et al., 2010; Knuesel et al., 2009; Wirths et al., 2001).

In den Mäusen fanden sich diese RELN-positiven Aggregate nur im sehr hohen Alter (P210) der TG Tiere.

Beim Menschen dagegen konnten die Ablagerungen bereits im präklinischen Stadium (CERAD A/Braak & Braak I-II) nachgewiesen werden und nahmen im Verlauf der Krankheit weiter zu.

Diese plaqueähnlichen Strukturen waren allein in den AD-erkrankten Gehirnen auffindbar und zudem in der Nähe von A β -Plaques angesiedelt, wobei aber keine Ko-Lokalisation vorlag (Abbildung 11E und Abbildung 19E). Nach Knuesel et al. (2009) finden sich diese RELN-Aggregate auch in gesunden alten Mäusen (P360 und älter). Im Gegensatz dazu zeigten die hier untersuchten Wildtypmäuse keine RELN-Ablagerungen bis zum spätesten untersuchten Zeitpunkt (P210). Möglicherweise waren die hier untersuchten Mäuse nicht alt genug, um schon RELN-Aggregate aufzuweisen; es fanden sich auch keine RELN-Ablagerungen in jungen oder alten gesunden Menschen.

Zumindest für die Menschen lässt sich feststellen, dass das Vorhandensein der A β -Pathologie offenbar eine Voraussetzung dafür ist, dass RELN-Ablagerungen entstehen können. Die biochemische Natur der RELN-Aggregate ist momentan noch unbekannt und bedarf weiterführender Untersuchungen. Vermutlich bestehen die RELN-Ablagerungen jedoch nicht aus fibrillären Strukturen, da eine Ko-Lokalisation mit ThioflavinS, einem histologischen Marker für fibrilläre Proteinstrukturen, nicht erkennbar war. Neben den amyloiden Fibrillen gibt es aber noch weitere krankhafte Proteinfaltungen, die nicht mit ThioflavinS angefärbt werden können. Erst kürzlich veröffentlichte *in vitro* Experimente untermauern diese Vermutung. In diesen konnte gezeigt werden, dass große Proteine zu toxischen Aggregaten akkumulieren, ohne dabei amyloide Fibrillen auszubilden, obwohl ihre Umgebung der Bildung solcher Strukturen förderlich ist (Ramshini et al., 2011). Es ist möglich, dass die Verarmung des freien RELN auf eine RELN-Aggregation in AD-erkrankten Gehirnen zurückzuführen ist. Aggregiertes RELN ist für eine Rezeptorbindung unbrauchbar.

5.1.3. Nachgeschaltete Mitglieder des RELN-Signalwegs

Sowohl APOER2 als auch VLDLR und DAB1 sind Mitglieder der RELN-Signalkaskade (Herz and Chen, 2006) und haben jeder für sich Einfluss auf die Inhibition der A β -Erzeugung, den Abtransport von β -Amyloid und den Schutz des Tau-Proteins vor Hyperphosphorylierung (Brich et al., 2003; Hoe and Rebeck, 2008; Hoe et al., 2006).

In TG und WT-Mäusen war eine APOER2-, VLDLR- und DAB1-Expression im HC gleichermaßen altersabhängig, aber krankheitsunabhängig herunterreguliert.

Im AD-erkrankten Menschen war das Proteinlevel von VLDLR reduziert und das APOER2-Level hingegen stabil. Für DAB1 war eine Überexpression feststellbar. Es bestand keine Veränderung im Proteinlevel der einzelnen Mitglieder der RELN-Signalkaskade in Bezug auf das Alter.

Eine krankheitsbedingte Überexpression von DAB1 im späten Stadium der AD im Menschen konnte gleichfalls in einer anderen Studie aufgezeigt werden (Muller et al., 2011). Es ist denkbar, dass eine erhöhte DAB1-Expression vom Gehirn dazu genutzt wird, einer Verknappung von RELN und VLDLR und einer gleichzeitigen Hyperphosphorylierung von Tau entgegen zu wirken.

5.1.4. Die RELN-Signalkaskade in murinen und humanen Gehirnen

Es gibt artspezifische Ähnlichkeiten und Unterschiede in den Expressionsmustern der RELN-Signalkaskade. Sowohl in den TG-Mäusen als auch bei den AD-Patienten zeigte sich eine früh einsetzende RELN-Reduktion. Auch RELN-Ablagerungen waren gleichermaßen auffindbar. Andererseits war eine altersbedingte Reduktion des RELN-Expressionslevels und der nachgeschalteten Proteine nur in den Hirnarealen von Mäusen nachweisbar. Gleiches gilt für eine veränderte RELN-Prozessierung.

Beim Menschen zeigte sich indes eine Störung für die nachgeschalteten Proteine in der RELN-Signalkaskade nur im Zusammenhang mit AD. Die artspezifischen Unterschiede lassen sich eventuell dadurch erklären, dass die hier verwendeten transgenen Mäuse ein Modell für die familiäre (monogenetische) Form der AD darstellen, wohingegen die AD-Patienten dieser Studie an der sporadischen Form von AD erkrankt sind.

Außerdem gibt es artspezifische Unterschiede in den Alters- und Krankheitsstadien, die eine weitere Erklärung für die verschiedenen Untersuchungsergebnisse sein können. Mäuse zwischen dem Alter P30 und P210 entsprechen einem früheren Alter und Krankheitsstadium im Vergleich zu den hier untersuchten Menschen im Alter von 33-80 Jahren und den AD-Stadien CERAD A/ Braak & Braak I-II bis CERAD C/Braak & Braak V-VI.

5.1.5. Ist die RELN-Reduktion eine Ursache oder eine Folge der AD?

Nach der Auswertung der Daten dieser Arbeit mehren sich die Hinweise darauf, dass eine RELN-Reduktion mit der AD-Pathologie assoziiert ist. Jedoch bleibt es letztlich immer noch ungeklärt, ob es sich bei dieser Störung um eine Ursache oder Folge der AD handelt.

Die Tatsache, dass TG Mäuse, die das mutierte APP tragen, eine RELN-Defizienz entwickeln, unterstützt die These, dass es sich bei dem Abfall von RELN um eine Folge der AD-ähnlichen Pathologie handelt.

Auf der anderen Seite belegen kürzlich veröffentlichte Arbeiten, dass eine Kreuzung von heterozygoten Reelermäusen mit transgenen AD-Mäusen eine beschleunigte AD-ähnliche Pathologie zur Folge hat (Kocherhans et al., 2010). Ergänzt man dies um den hiesigen Befund, wonach eine RELN-Reduktion sogar noch vor Beginn der AD-ähnlichen Pathologie eintritt, so spricht alles dafür, dass der RELN-Mangel eher eine mögliche Ursache denn Konsequenz von AD ist.

In beiden Fällen, ob Folge oder Ursache, wird auf Grund der bereits bestehenden Studien in Verbindung mit den hier dargestellten Ergebnissen evident, dass die Störung des RELN-Signalwegs und die AD sich wechselseitig beeinflussen und verstärken.

Da die RELN-Defizienz (im Gegensatz zu den restlichen Protagonisten der RELN-Signalkaskade) bereits im präklinischen Stadium von AD-Patienten auftritt, lässt sich RELN möglicherweise als präklinischer Marker zur Frühdiagnostik einsetzen. Dafür wäre es von Vorteil, das RELN-Level im Plasma messen zu können. Eine AD-Erkrankung könnte so frühzeitig und unkompliziert durch ein *Screening* von RELN im Blut sicher diagnostiziert und infolge dessen die Therapiemöglichkeiten zeitiger als bisher begonnen werden.

Zukünftige prospektive Studien sollten untersuchen, ob das im Blut befindliche RELN tatsächlich aus dem Gehirn stammt. Untersuchungen der Modifikationen von RELN (etwa zum Glykosylierungsstatus) wären dafür hilfreich.

Im nächsten Schritt wäre eine longitudinal angelegte Studie, beginnend mit Menschen ohne AD, nötig, um den Zeitpunkt zu ermitteln, wann die RELN-Reduktion in AD-Patienten einsetzt. Retrospektiv lässt sich dann ermitteln, wann bei den Teilnehmern, die im Verlauf der Studie an AD erkrankten, eine RELN-Reduktion

vorlag. Dadurch lässt sich zum Einen ableiten, ab welchem Zeitpunkt ein *Screening* von RELN eingesetzt werden kann, um für die Diagnostik von AD hilfreich zu sein. Im Weiteren nähert man sich einer Antwort auf die Frage, ob die Verminderung des RELN-Levels eher eine Ursache oder Folge der AD ist.

5.2. Reelinsignalkaskade bei maternalen und postnatalen Aktivität

Die vorangegangenen Untersuchungen konnten aufzeigen, dass RELN bereits sehr früh in der Entwicklung der AD-Pathologie gestört ist. Die AD beginnt bereits zwischen 20 und 30 Jahren bevor sich erste klinische Symptome manifestieren (Blennow et al., 2006). Medikamente wirken bislang allerdings nur auf die Symptomatik der AD ein und besitzen teils starke Nebenwirkungen. Hoffnung auf präventive Maßnahmen, oder doch zumindest eine Verlangsamung des Verlaufs der AD, geben Studien, die nachgewiesen haben, dass physische Aktivität die A β -Pathologie reduzieren kann (Adlard et al., 2005; Ambree et al., 2006; Lazarov et al., 2005).

Um die Auswirkung von *Enrichment* auf den Reelinsignalweg zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Nachkommen von Mäusen untersucht, die während ihrer Trächtigkeit mittels eines Laufrades verstärkt die Möglichkeit zu physischer Aktivität erhielten (pränatales *Enrichment*). Außerdem wurden auch solche Tiere auf ihr Expressionsmuster des RELN-Signalwegs untersucht, die ein postnatales *Enrichment* in Form eines Laufrades nutzen konnten.

5.2.1. Maternale körperliche Aktivität erhöht das Proteinlevel an RELN der Nachkommenschaft

In pränatal stimulierten TG und WT-Mäusen, war ein Anstieg von RELN, insbesondere in den Subregionen des HC, messbar. Dieser Anstieg kompensierte den normalerweise zu beobachtenden RELN-Abfall in den unstimulierten TG Mäusen (4.1.1.1). Hierbei fiel besonders auf, dass sich dieser Effekt nicht bei Mäusen zeigte, die einem postnatalen *Enrichment* ausgesetzt waren.

Die nachgeschalteten Proteine der RELN-Signalkaskade APOER2, VLDLR und DAB1 zeigten keine Veränderung im Expressionslevel, weder bei pränataler noch postnateller Stimulation.

Eine pränatale Stimulation führt zu einer geringeren A β -Plaquebelastung und einer geringeren amyloidogenen Prozessierung von APP (Herring et al., 2012). Dies kann einerseits zur Entfaltung einer funktionsfähigen RELN-Signalkaskade beitragen, andererseits kann das Vorhandensein von RELN dann wiederum zu einer Reduktion der amyloidogenen Prozessierung von APP führen (Hoe et al., 2006). Es scheint also eine wechselseitige Beeinflussung zwischen der Reduktion der A β -Plaquebelastung und der amyloidogenen Prozessierung von APP und dem RELN-Signalweg zu geben.

In solchen Mäusen, die nur postnatales *Enrichment* vorfanden, wurden ebenfalls weniger A β -Plaques ausgezählt (Ambree et al., 2006; Herring et al., 2011). Dies scheint allerdings nicht im Zusammenhang mit dem RELN-Signalweg zu stehen.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sowohl die pränatale als auch die postnatale Stimulation von Mäusen einer AD-ähnlichen Pathologie entgegenwirken kann. Indes ist der Zeitpunkt der physischen Stimulation ausschlaggebend dafür, ob und welche molekulare Strategie im Gehirn angestoßen wird, um die Krankheit besser zu tolerieren.

Die vorliegende Studie zusammen mit den bisher veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen lassen den Schluss zu, dass eine Stimulation in den frühesten Phasen der Ontogenese des TG Nachwuchses die ersten Schritte der Amyloidkaskade hemmt und sich so eine funktionierende RELN-Signalkaskade ausbilden kann.

Hingegen mildert die postnatale Bewegung ausschließlich die Konsequenz des Krankheitsverlaufs ab, was jedoch eine Rettung des RELN-Signalwegs nicht bewirken kann.

Um eine Einseitigkeit im Geschlechteraspekt der Untersuchung des pränatalen *Enrichments* zukünftig auszuschließen wäre es interessant, ob eine paternale Aktivität ebenfalls zu einer milderer Ausprägung der AD-Pathologie in TG-Nachkommen führt. Diese Untersuchung könnte auch ableiten, ob die Umwelteinflüsse noch vor der Zeugung oder aber erst im Mutterleib entscheidend für die Ausprägung der AD-ähnlichen Pathologie sind.

5.2.2. Epigenetik als mögliche Verbindung zwischen Verhalten und Hirnplastizität

Als mögliche Ursache dafür, dass sich *Enrichment* auf die Nachkommen positiv auswirkt, sind epigenetische Prozesse vorstellbar. Hierzu zählt die Methylierung der DNA ebenso wie Modifikationen an Histonen und Chromatin und auch transkriptionelle Rückkopplungen (Ma et al., 2010). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es in einem Mausmodell, in welchem kurzzeitig und räumlich begrenzt ein Neuronenverlust herbeiführt wurde, zu einem Wiederaufleben des Lernverhaltens und zur Re-Etablierung der LTP, in Folge einer durch *Enrichment* induzierten Chromatinmodellierung kommt (Fischer et al., 2007). Andere Studien belegen, dass die Nahrungsaufnahme der Eltern den Cholesterin- und Fettmetabolismus der Nachkommen über die Cytosinmethylierung beeinflussen kann (Caron et al. 2010). Beides spricht für die Plausibilität der hier nachgewiesenen Ergebnisse.

Eine Untersuchung zum Methylierungsstatus der Promotorregion von *Reln* sollte nachweisen, ob die Überexpression von RELN in TG- und WT-Nachkommen nach einer maternalen Aktivität, eine Ursache in einem epigenetischen Mechanismus hat. Die durchgeführten Methylierungsuntersuchungen waren jedoch ohne Erfolg, vermutlich auf Grund der geringen Sensitivität der Methode. Zukünftige Untersuchungen mit einer sensitiveren Methode könnten zeigen, ob epigenetische Veränderungen im Erbgut der heranwachsenden Nachkommen durch das Verhalten der Mutter herbeigeführt werden können.

6. Zusammenfassung

Die Ursache für die Alzheimer-Krankheit (AD) ist bis heute ungeklärt. Derzeit zur Verfügung stehende Therapiemöglichkeiten behandeln allein die Symptomatik, mit teils erheblichen Nebenwirkungen. Die aktuelle Forschung zeigt, dass physische und kognitive Aktivität nachweislich zu einer Verbesserung der Hirnfunktionen in gesunden und an AD-Pathologie erkrankten Mäusen führt. Da Gedächtnisstörungen eines der führenden klinischen Merkmale der AD sind und die RELN-Signalkaskade im erwachsenen Gehirn eine Schlüsselrolle für die Gedächtnisbildung und die Plastizität spielt, legt ein Zusammenhang zwischen dem RELN-Signalweg und der AD nahe. Vereinzelte und z.T. widersprüchliche Studien postulieren Störungen im RELN-Level bei Individuen mit einer ausgeprägten AD-Pathologie. Eine systematische Untersuchung des Einflusses des Alters und der AD auf das Expressionsprofil des gesamten RELN-Signalwegs in AD-relevanten Hirnregionen fehlte bislang. Ob die Veränderung des Signalwegs eine Ursache oder Folge der AD ist, bedarf ebenfalls noch einer Klärung.

In dieser Arbeit wurde 1.) erstmals im Detail das Expressionsmuster der gesamten RELN-Signalkaskade (mit RELN, APOER2, VLDLR und DAB1) in AD-relevanten Hirnarealen (FC, EC und HC) in einem transgenen AD-Mausmodell sowie AD-Patienten und altersadaptierten Kontrollgruppen gemessen. 2.) Zusätzlich wurde der Einfluss von pränataler und postnataler physischer Stimulation (*Environmental Enrichment*) auf Expression des RELN-Signalweges in TG- und WT-Mäusen untersucht.

Sowohl die AD-Pathologie als auch das Alter beeinflussen die Expression des RELN-Signalweges. Dies verläuft art-, hirnareal- und molekülspezifisch. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine RELN-Defizienz ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der AD-Pathologie ist. Bei der Maus tritt diese im Hippokampus noch vor der Bildung erster β -Amyloidplaques (postnatal Tag 30) auf und beim Menschen im Frontalkortex bereits im präklinischen Stadium (CERAD A/Braak & Braak I-II). Ebenso zeigte sich eine AD-abhängige RELN-Prozessierung in TG-Mäusen, sowie RELN-positive Aggregate in erkrankten Menschen und Mäusen. Für VLDLR, APOER2 und DAB1 zeigten sich Störungen des Expressionsmusters in alten Mäusen und in AD-erkrankten Menschen. Die frühzeitige Störung der RELN-Expression sowohl in der Maus als auch im Mensch könnte erste Hinweise liefern, dass es sich dabei um eine

kausale Rolle in der Entstehung von AD handelt. Zudem könnte RELN in Zukunft als möglicher präklinischer Marker zur Diagnose von AD eingesetzt werden.

Neue Erkenntnisse erbrachte auch die Untersuchung des Einflusses von *Enrichment* auf die Ausprägung der RELN-Signalkaskade in einem transgenen AD-Mausmodell. Pränatal stimulierte Mäuse zeigten ein erhöhtes RELN-Level im Vergleich zu unstimulierten Mäusen. Eine postnatale Aktivität vermochte das Proteinlevel von RELN nicht zu verändern. VLDLR, APOER2 und DAB1 zeigten sich weder durch ein pränatales noch ein postnatales *Enrichment* verändert. Der Zeitpunkt des Einsatzes von *Enrichment* hat wesentlichen Einfluss auf die vom Körper verwendete Strategie gegen die AD-Pathologie vorzugehen. Im Bezug auf das für die Plastizität des Gehirns bedeutende RELN scheint eine sehr frühe, pränatale Stimulation am erfolgversprechendsten, um der AD-Pathologie entgegen zu wirken.

Literaturverzeichnis

Abdolmaleky, H.M., Cheng, K.H., Russo, A., Smith, C.L., Faraone, S.V., Wilcox, M., Shafa, R., Glatt, S.J., Nguyen, G., Ponte, J.F., Thiagalingam, S., Tsuang, M.T. (2005). Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.* *134*, 60–66.

Abraham, H., and Meyer, G. (2003). Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus* *13*, 715-727.

Abraham, H., Toth, Z., and Seress, L. (2004). A novel population of calretinin-positive neurons comprises reelin-positive Cajal-Retzius cells in the hippocampal formation of the adult domestic pig. *Hippocampus* *14*, 385-401.

Adlard, P.A., Perreau, V.M., Pop, V., and Cotman, C.W. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* *25*, 4217-4221.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., *et al.* (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* *21*, 383-421.

Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., and Soriano, E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci* *18*, 7779-7799.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatrie Psychisch-Gerichtl Med* *64*, 146-148.

Ambree, O., Leimer, U., Herring, A., Gortz, N., Sachser, N., Heneka, M.T., Paulus, W., and Keyvani, K. (2006). Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways. *Am J Pathol* *169*, 544-552.

Arai, J.A., Li, S., Hartley, D.M., and Feig, L.A. (2009). Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment. *J Neurosci* 29, 1496-1502.

Attems, J., Lintner, F., and Jellinger, K.A. (2004). Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol* 107, 283-291.

Ballif, B.A., Arnaud, L., and Cooper, J.A. (2003). Tyrosine phosphorylation of Disabled-1 is essential for Reelin-stimulated activation of Akt and Src family kinases. *Brain Res Mol Brain Res* 117, 152-159.

Baloyannis, S.J. (2005). Morphological and morphometric alterations of Cajal-Retzius cells in early cases of Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study. *Int J Neurosci* 115, 965-980.

Barnes, D.E. and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819-828.

Beffert, U., Morfini, G., Bock, H.H., Reyna, H., Brady, S.T., and Herz, J. (2002). Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* 277, 49958-49964.

Bick-Sander, A., Steiner, B., Wolf, S.A., Babu, H., and Kempermann, G. (2006). Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3852-3857.

Binder, L.I., Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., and Berry, R.W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739, 216-223.

Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.

Boche, D., and Nicoll, J.A. (2008). The role of the immune system in clearance of Abeta from the brain. *Brain Pathol* 18, 267-278.

- Bock, H.H., Jossin, Y., Liu, P., Forster, E., May, P., Goffinet, A.M., and Herz, J. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination. *J Biol Chem* 278, 38772-38779.
- Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M.S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J.M., Del Rio, J.A., Blesa, R., Soriano, E., *et al.* (2006). Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5573-5578.
- Botella-Lopez, A., Cuchillo-Ibanez, I., Cotrufo, T., Mok, S.S., Li, Q.X., Barquero, M.S., Dierssen, M., Soriano, E., and Saez-Valero, J. (2010). Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37, 682-691.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- Brich, J., Shie, F.S., Howell, B.W., Li, R., Tus, K., Wakeland, E.K., Jin, L.W., Mumby, M., Churchill, G., Herz, J., *et al.* (2003). Genetic modulation of tau phosphorylation in the mouse. *J Neurosci* 23, 187-192.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., and Arrighi, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3, 186-191.
- Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H., and Arendt, T. (2007). Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98-102.
- Carone, B. R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J. M., Hart, C. E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P. D., Meissner, A., Weng, Z., Hofmann, H. A., Friedman, N., and Rando, O. J. (2010) Paternally induced transgenerational environmental re-programming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084–1096

Castellani, R.J., Lee, H.G., Zhu, X., Nunomura, A., Perry, G., and Smith, M.A. (2006). Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. *Acta Neuropathol* 111, 503-509.

Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I., and Herz, J. (2005). Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci* 25, 8209-8216.

Chen, Y., Durakoglugil, M.S., Xian, X., and Herz, J. (2010). ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12011-12016.

Chin, J., Massaro, C.M., Palop, J.J., Thwin, M.T., Yu, G.Q., Bien-Ly, N., Bender, A., and Mucke, L. (2007). Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27, 2727-2733.

Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., *et al.* (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562-21570.

Clapp, J.F., 3rd (1996). Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *J Pediatr* 129, 856-863.

Curran, T., and D'Arcangelo, G. (1998). Role of reelin in the control of brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 285-294.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24, 471-479.

Deguchi, K., Inoue, K., Avila, W.E., Lopez-Terrada, D., Antalffy, B.A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., Mikoshiba, K., D'Arcangelo, G., and Armstrong, D.L. (2003).

Reelin and disabled-1 expression in developing and mature human cortical neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 676-684.

Del Rio, J.A., Heimrich, B., Super, H., Borrell, V., Frotscher, M., and Soriano, E. (1996). Differential survival of Cajal-Retzius cells in organotypic cultures of hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 16, 6896-6907.

Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., *et al.* (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385, 70-74.

Doehner, J., Madhusudan, A., Konietzko, U., Fritschy, J.M., and Knuesel, I. (2010). Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. *J Alzheimers Dis* 19, 1339-1357.

Durakoglugil M.S., Chen Y., White C.L., Kavalali E.T., Herz J. (2009). Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15938-15943.

Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5-36.

Falconer, D.S. (1951). Two new mutants, Trembler and 'Reeler', with neurological actions in the house mouse. *J Genet* 50, 182–201.

Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., and van Duijn, C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349-1356.

Fatemi, S.H., Earle, J.A., McMenomy, T. (2000). Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol. Psychiatry* 5, 654–663.

Fatemi, S.H., Kroll, J.L., Strydom, J.M. (2001). Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport* 12, 3209–3215.

Fatemi, S.H. (2005). Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease. *Mol Psychiatry* 10, 251-257.

Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L. H. (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182

Forman, H.J., and Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166, S4-8.

Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., and Winblad, B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol* 3, 343-353.

Frautschy, S.A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T.C., Hsiao, K., Cole, G.M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol.* 152, 307-317.

Friedland, R.P., Fritsch, T., Smyth, K.A., Koss, E., Lerner, A.J., Chen, C.H., Petot, G.J., and Debanne, S.M. (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3440-3445.

Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8, 570-575.

Goffinet, A.M., So, K.F., Yamamoto, M., Edwards, M., and Caviness, V.S., Jr. (1984). Architectonic and hodological organization of the cerebellum in reeler mutant mice. *Brain Res* 318, 263-276.

Golde, T.E. (2002). Inflammation takes on Alzheimer disease. *Nat Med* 8, 936-938.

Harvey, R.J., Skelton-Robinson, M., and Rossor, M.N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 1206-1209.

Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K., and Iida, S. (1970). Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry* 9, 2858-2865.

Haass, C. and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

He, X., Cooley, K., Chung, C.H., Dashti, N., and Tang, J. (2007). Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production. *J Neurosci* 27, 4052-4060.

Hebb, D.O. (1947). The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am Psychol* 2, 306-307.

Heneka, M.T., and O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.

Herring, A., Yasin, H., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2008). Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice. *Brain Pathol* 18, 32-39.

Herring, A., Ambree, O., Tomm, M., Habermann, H., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2009). Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol* 216, 184-192.

Herring, A., Blome, M., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2010). Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. *Brain Pathol* 20, 166-175.

Herring, A., Lewejohann, L., Panzer, A.L., Donath, A., Kroll, O., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2011). Preventive and therapeutic types of environmental

enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* 42, 530-538.

Herring, A., Donath, A., Yarmolenko, M., Uslar, E., Conzen, C., Kanakis, D., Bosma, C., Worm, K., Paulus, W., and Keyvani, K. (2012). Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J* 26, 117-128.

Herz, J., and Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7, 850-859.

Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481-489.

Hoe, H.S., Tran, T.S., Matsuoka, Y., Howell, B.W., and Rebeck, G.W. (2006). DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. *J Biol Chem* 281, 35176-35185.

Hoe, H.S., and Rebeck, G.W. (2008). Functional interactions of APP with the apoE receptor family. *J Neurochem* 106, 2263-2271.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., *et al.* (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2892-2897.

Impagnatiello, F., Guidotti, A.R., Pesold, C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Smalheiser, N.R., Davis, J.M., Pandey, G.N., Pappas, G.D., Tueting, P., Sharma, R.P., Costa, E. (1998). A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15718–15723.

Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (2004). The central fragment of Reelin, generated by proteolytic

processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci* 24, 514-521.

Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.

Kim, H., Lee, S.H., Kim, S.S., Yoo, J.H., and Kim, C.J. (2007). The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int J Dev Neurosci* 25, 243-249.

Knuesel, I., Nyffeler, M., Mormede, C., Muhia, M., Meyer, U., Pietropaolo, S., Yee, B.K., Pryce, C.R., LaFerla, F.M., Marighetto, A., *et al.* (2009). Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiol Aging* 30, 697-716.

Kocherhans, S., Madhusudan, A., Doehner, J., Breu, K.S., Nitsch, R.M., Fritschy, J.M., and Knuesel, I. (2010). Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 30, 9228-9240.

Lacor, P.N., Grayson, D.R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E., and Guidotti, A. (2000). Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3556-3561.

Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 150, 1-106.

Lambert de Rouvroit, C., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y., and Goffinet, A.M. (1999). Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp Neurol* 156, 214-217.

Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., and Sisodia, S.S. (2005). Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701-713.

Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-1159.

Liu, H.L., Zhao, G., Cai, K., Zhao, H.H., and Shi, L.D. (2011). Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res* 218, 308-314.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Ma, D. K., Marchetto, M. C., Guo, J. U., Ming, G. L., Gage, F. H., and Song, H. (2010) Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338–1344

Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15, 1437-1449.

Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 425-427.

Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., and Mandelkow, E.M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17, 83-90.

Marques, C.A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W.E., and Eckert, A. (2003). Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem* 278, 28294-28302.

Martinez-Cerdeno, V., Galazo, M.J., Cavada, C., and Clasca, F. (2002). Reelin immunoreactivity in the adult primate brain: intracellular localization in projecting and local circuit neurons of the cerebral cortex, hippocampus and subcortical regions. *Cereb Cortex* 12, 1298-1311.

Meyer, M.R., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Wyse, B.W., and Breitner, J.C. (1998). APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* 19, 321-322.

Miettinen, R., Riedel, A., Kalesnykas, G., Kettunen, H.P., Puolivali, J., Soininen, H., and Arendt, T. (2005). Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. *J Chem Neuroanat* 30, 105-118.

Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., and Inestrosa, N.C. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 62, 633-648.

Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., and Berg, L. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479-486.

Mirra, S.S., Hart, M.N. and Terry, R.D. (1993). Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 117, 132-144.

Muller, T., Loosse, C., Schrotter, A., Schnabel, A., Helling, S., Egensperger, R., and Marcus, K. (2011). The AICD interacting protein DAB1 is up-regulated in Alzheimer frontal cortex brain samples and causes deregulation of proteins involved in gene expression changes. *Curr Alzheimer Res* 8, 573-582.

Nichol, K.E., Poon, W.W., Parachikova, A.I., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (2008). Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation* 5, 13.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981-989.

- Nithianantharajah, J., and Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 697-709.
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C.C., Sheldon, M., and D'Arcangelo, G. (2004). Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 41, 71-84.
- Niu, S., Yabut, O., and D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* 28, 10339-10348.
- Orgogozo J.M., Gilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F., Boada M., Frank A., Hock C. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54.
- Ohkubo, N., Lee, Y.D., Morishima, A., Terashima, T., Kikkawa, S., Tohyama, M., Sakanaka, M., Tanaka, J., Maeda, N., Vitek, M.P., *et al.* (2003). Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3beta cascade. *FASEB J* 17, 295-297.
- Pappas, G.D., Kriho, V., Liu, W.S., Tremolizzo, L., Lugli, G., and Larson, J. (2003). Immunocytochemical localization of reelin in the olfactory bulb of the heterozygous reeler mouse: an animal model for schizophrenia. *Neurol Res* 25, 819-830.
- Pesold, C., Impagnatiello, F., Pisu, M.G., Uzunov, D.P., Costa, E., Guidotti, A., and Caruncho, H.J. (1998). Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3221-3226.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., and Gauthier, S. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342, 697-699.

- Poirier, J. (1994). Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17, 525-530.
- Rakic, P., and Caviness, V.S., Jr. (1995). Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* 14, 1101-1104.
- Ramos-Moreno, T., Galazo, M.J., Porrero, C., Martinez-Cerdeno, V., and Clasca, F. (2006). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 23, 401-422.
- Ramshini, H., Parrini, C., Relini, A., Zampagni, M., Mannini, B., Pesce, A., Saboury, A.A., Nemat-Gorgani, M., and Chiti, F. (2011). Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. *PLoS One* 6, e16075.
- Rice, D.S., and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24, 1005-1039.
- Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J., and Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40, 260-269.
- Saez-Valero, J., Costell, M., Sjogren, M., Andreasen, N., Blennow, K., and Luque, J.M. (2003). Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 72, 132-136.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D.J. (2011). Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med* 17, 1521.
- Strasser, V., Fasching, D., Hauser, C., Mayer, H., Bock, H.H., Hiesberger, T., Herz, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., Pramatarova, A., *et al.* (2004). Receptor clustering is involved in Reelin signaling. *Mol Cell Biol* 24, 1378-1386.

Tansey, M.G., McCoy, M.K., and Frank-Cannon, T.C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208, 1-25.

Timm, T., Matenia, D., Li, X.Y., Griesshaber, B., and Mandelkow, E.M. (2006). Signaling from MARK to tau: regulation, cytoskeletal crosstalk, and pathological phosphorylation. *Neurodegener Dis* 3, 207-217.

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689-701.

Um, H.S., Kang, E.B., Leem, Y.H., Cho, I.H., Yang, C.H., Chae, K.R., Hwang, D.Y., and Cho, J.Y. (2008). Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med* 22, 529-539.

van Groen, T., Miettinen, P., and Kadish, I. (2003). The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13, 133-149.

Vasto, S., Candore, G., Listi, F., Balistreri, C.R., Colonna-Romano, G., Malavolta, M., Lio, D., Nuzzo, D., Mocchegiani, E., Di Bona, D., *et al.* (2008). Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 58, 96-105.

Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2004). Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181-193.

Wang, R.Y., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 8, 4777-4790.

- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., and Herz, J. (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 277, 39944-39952.
- Wilson, R.S., Mendes De Leon, C.F., Barnes, L.L., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2002). Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA* 287, 742-748.
- Wirths, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., and Bayer, T.A. (2001). Reelin in plaques of beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 316, 145-148.
- Wisniewski, T., Konietzko, U. (2008). Amyloid- β immunisation for Alzheimer's disease *Lancet Neurol Neurosci* 7, 805-8011.
- Wolf, S.A., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M., and Kempermann, G. (2006). Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60, 1314-1323.
- Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12, 1005-1015.
- Zhang-Nunes, S.X., Maat-Schieman, M.L., van Duinen, S.G., Roos, R.A., Frosch, M.P., and Greenberg, S.M. (2006). The cerebral beta-amyloid angiopathies: hereditary and sporadic. *Brain Pathol* 16, 30-39.
- Zlokovic, B.V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28, 202-208.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kathy Keyvani und Herrn Prof. Dr. Hynek Burda recht herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. Keyvani gab mir vor drei Jahren Gelegenheit zur Anfertigung dieser Dissertation und betreute mich über diese Zeitspanne hinweg intensiv, fordernd und fördernd. Ihr gilt besonderer Dank für Ihr starkes Engagement und die vielen interessanten Diskussionen, für die fachliche und menschliche Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit essentiell waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Arne Herring bedanken, der während meines Promotionsvorhabens auf restlos alle Fragen eine Antwort wusste bzw. wissen musste, mit dem ich Büro und Forschungsgegenstand teilte.

All jenen Kollegen und Studenten, die ich in diesen drei Jahren in Münster und Essen näher kennenlernen durfte, die diese Arbeit mit eigenen Beiträgen, Ratschlägen und Korrekturen förderten, die vor allem auch jenseits des Laboralltages zu Konstanten meines Lebens, kurz: zu Freunden, wurden, sei herzlich gedankt:

- Björn Koos danke ich für die Freundschaft, viele gute Ratschläge und natürlich für die Korrektur der Arbeit
- Amke Hesse, Astrid Jeibmann, Alex Lürpke, Kathrin Halama, Andrea Wagner, Lars Rüther, und Sonja Mertsch danke ich für Freundschaften und eine tolle Zeit in Münster
- Linda van den Berg (danke fürs Last-Minute-Lesen), Saskia Ting, Sara Tusche, Steffi Bertram (danke ich für unsere D-Dorf-Treffen) sowie Anette Kurowski, Dimitrios Kanakis, Mareike Müller, Esra Köser, Andrea Hartz danke ich für die Unterstützung, Freundschaften und die tolle Zeit in Essen
- Katharina Steiner, Manuel Widera, Catharina Conzen, Samira Hamzehian, Maxim Yarmolenko, Ellen Uslar und Claudius Bosma: durch euch kam richtig Leben ins Labor. Ich danke auch für die großartigen Ablenkungen vom Laboralltag

„Früher, wenn man sich keine Namen merken konnte, hieß das vergesslich. Inzwischen heißt das Alzheimer. Und wieder muss man sich einen Namen merken“ (Harry Rowohlt). In diesem Sinne bin ich all den hier nicht namentlich Genannten nicht minder verbunden.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion bedanken. Ich konnte so Vieles erst erleben, weil ihr mich immer meinen Weg habt gehen lassen, über Kontinente hinweg.

Lieber Felix, danke für Liebe, Freundschaft, Verständnis und Geduld!

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

Publizierte Abstracts:

Donath, A., Herring, A., Kanakis, D., K.M. Steiner, K.M., Widera, M.P., Paulus, W. and Keyvani, K. Reelin depletion in the brain is an early phenomenon in the Alzheimer's disease. Abstracts + Fortbildungs-Handouts / Neurowoche Mannheim [Elektronische Ressource]: 21.-25.9.2010, ISBN: 978-3-940017-64-2

Donath, A., Herring, A., Steiner, K.M., Widera M.P., Kanakis, D., Paulus, W. and Keyvani, K. Reelin depletion in the brain is an early phenomenon in the Alzheimer's disease. „Neuro-Visionen 6“-Tagung des Kompetenznetz Neuro-NRW, 07.09.2010, Ruhr-Universität Bochum

Originalarbeiten:

Herring, A., Lewejohann, L., Panzer, A.L., **Donath, A.**, Kroell, O., Sachser, N., Paulus, W. and Keyvani, K. (2011) Preventive and therapeutic types of environmental enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol Dis.* 42, 530-538.

Herring, A., **Donath, A.**, Yarmolenko, M., Uslar, E., Conzen, C., Kanakis, D., Bosma, C., Worm, K., Paulus, W., and Keyvani, K. (2012). Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J.* 26, 117-128.

Herring, A.*, **Donath A.***, Steiner K.M.; Widera, M.P.; Hamzehian S.; Kanakis D., Koelble, K., ElAli, A., Hermann D.M., Paulus, W. and Keyvani, K. (2012) Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer pathology. *J Alzheimers Dis.* 29, 1–17.

* equally contributing authors